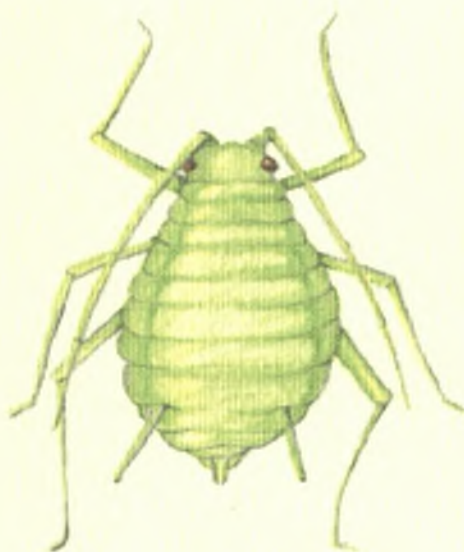


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ



**Μετάδοση του μη έμμονου ιού Υ της πατάτας (PVY^N) με
άπτερες αφίδες
Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)
σε διάφορες ποικιλίες καπνού**

ΣΟΦΙΑ Φ. ΖΑΠΑΝΤΟΥΛΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΟΛΟΣ, 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8270/1
Ημερ. Εισ.: 22-03-2010
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ
2009
ΖΑΠ

**Μετάδοση του μη έμμονου ιού Υ της πατάτας (PVY^N) με
άπτερες αφίδες
Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)
σε διάφορες ποικιλίες καπνού**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Παπαδόπουλος Νικ.

Επίκουρος καθηγητής
Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Χα Αβραάμ

Αναπληρωτής
Επίκουρος καθηγητής
Κηπευτικών καλλιεργειών
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βέλλιος Ευάγ.

Λέκτορας
Φυτοπαθολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της πτυχιακής διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω αυτούς που με βοήθησαν και με στήριξαν σε αυτήν μου την προσπάθεια.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον κ. Ι. Α. Τσιτσιπή, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της παρούσα διατριβής και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Επίσης θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διατριβής και την πολύτιμη βοήθειά του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Καναβάκη Ολυμπία για την πολύτιμη βοήθειά της και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Αβραάμ Χα, Επίκουρο καθηγητή κηπευτικών λαχανικών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στον κ. Ε. Βέλλιο, Λέκτορα Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις υποδείξεις και τις απαραίτητες διορθώσεις της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συνεργασία μας κατά την πραγματοποίηση του πειράματος.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ιδιαίτερα πολύτιμη ψυχολογική τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
Περίληψη	7
Abstract	9
Σκοπός	11
1. Εισαγωγή	12
1.1 Γενικά	12
1.2 Η αφίδα <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	14
1.2.1 Ταξινομική θέση	14
1.2.2 Μορφολογία ενηλίκου	14
1.2.3 Ξενιστές	15
1.2.4 Βιολογία	16
1.2.5 Ζημιές	18
1.2.6 Καταπολέμηση	20
1.3 Ο ιός Y της πατάτας (<i>Potato virus Y</i> ή <i>PVY</i>)	23
1.3.1 Φυλές	25
1.3.2 Γεωγραφική διανομή	25
1.3.3 Ξενιστές	26
1.3.4 Συμπτώματα	27
1.3.5 Μετάδοση	28
1.3.6 Ανίχνευση	32
1.3.7 Έλεγχος του PVY	32
1.4 Μετάδοση ιών με έντομα	35
1.4.1 Μετάδοση με αφίδες	36
1.4.1.1 Μη-έμμονοι ιοί	37
1.4.1.1.1 Θεωρίες μη-έμμονης μετάδοσης ιών	39
1.4.1.1.2 Ημί-έμμονοι ιοί	40
1.4.1.1.3 Έμμονοι ιοί	41
Πίνακας 3. Παραδείγματα ιών που μεταδίδονται με αφίδες (Κατής, 2000)	43
1.5 Μηχανική μετάδοση ιών	43
1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηχανική μετάδοση με χυμό	45
1.6 Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA	47
1.6.1 Κατηγορίες άμεσης ELISA	48
1.6.1.1 Άμεση DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Method-ELISA)	48
1.6.1.2 Άμεση ACP-ELISA (Antigen Coated Plated ELISA)	50
1.6.2 Έμμεση ELISA (Indirect ELISA)	50
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
1. Εισαγωγή	53
2. Υλικά και Μέθοδοι	55
2.1 Ανάπτυξη φυτών καπνού	55
2.2 Συντήρηση του ιού	56
2.3 Διατήρηση αποικιών αφίδων	57
2.4 Διαδικασία μετάδοσης PVY από άπτερα ενήλικα θυληκά άτομα	58
3. Αποτελέσματα	59
4. Συζήτηση- Συμπεράσματα	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Περίληψη

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), γνωστή και ως η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος αφού προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά που προκαλεί, θεωρείται και ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιώσεων. Πραγματοποιώντας επιφανειακά νύγματα δοκιμών διάρκειας λίγων δευτερολέπτων, μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά πάνω από 100 φυτικούς ιούς, μεταξύ των οποίων και ο μη έμμο-νος ιός Υ της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY).

Στην παρούσα διατριβή, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα μετάδοσης της νεκρωτικής φυλής του ιού Υ της πατάτας (PVY^N), από άπτερα άτομα της αφίδας *M. persicae*, σε φυτά καπνού διαφορετικών ποικιλιών. Η ανάπτυξη των αποικιών των αφίδων έγινε στο εργαστήριο υπό ελεγχόμενες συνθήκες, ενώ οι αρχικοί κλώνοι των αποικιών προέρχονταν από τις περιοχές της Μελί-κης του νομού Ημαθίας και την περιοχή των Λεχωνίων του νομού Μαγνησίας. Μορφομετρικές και μοριακές μελέτες στον πληθυσμό της *Myzus persicae*, των δύο αυτών περιοχών, έδειξαν ότι, οι πληθυσμοί που προέρχονται από τη με-λίκη, ανήκουν στο υποείδος *M. persicae nicotianae*, το οποίο παρουσιάζει εξειδίκευση στην επιλογή του ξενιστή και συγκεκριμένα αποικίζει τον καπνό *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). Οι πληθυσμοί που προέρχονται από τα Λεχώνια, ανήκουν στο τάξο *M. persicae sensu stricto* (s. str.) το οποίο είναι πολυφάγο. Αποικίζει τον καπνό όσο και άλλους δευτερεύοντες ξενιστές.

Η μετάδοση του ιού πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο. Την πηγή μό-λυνσης αποτέλεσαν φυτά καπνού, στα οποία ο ιός μεταδόθηκε με μηχανική μετάδοση. Ο χρόνος πρόσληψης και μετάδοσής του ήταν ελεγχόμενος. Συ-γκεκριμένα, ο χρόνος πρόσληψης του ιού από το μολυσμένο φυτό, ήταν τρία λεπτά, και ο χρόνος διατήρησης των αφίδων στα υγιή φυτά καπνού ήταν δέκα λεπτά.

Σε χρονικό διάστημα δεκαπέντε (15) ημερών μετά την αφιδομετάδοση, τα φυτά καπνού εξετάστηκαν με την μέθοδο ELISA για την ανίχνευση του PVY^N. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι: α)και το εξειδι-κευμένο (*M. persicae nicotianae*) και το πολυφάγο (*M. persicae sensu stricto*) είδος μεταδίδουν αποτελεσματικά τη νεκρωτική φυλή του PVY και β) ο παρά-

γοντας ποικιλία δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού, αφού τα άτομα αναγνωρίζουν το είδος ως ξενιστή και μεταδίδουν τον ιό.

Αξίζει να σημειωθεί η σημασία της παρουσίας του είδους *M. persicae* σε μια περιοχή όπου καλλιεργείτε καπνός. Η εξειδίκευση που παρουσιάζει το υποείδος *M. persicae nicotianae* στον καπνό, αλλά και η μη απόρριψή του ως ξενιστή από το υποείδος *M. persicae sensu stricto*, έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αύξηση του πληθυσμού των αφίδων. Το μεγάλο μέγεθος του πληθυσμού των αφίδων σε συνδυασμό με τη μεγάλη μολυσματική ικανότητα που παρουσιάζουν και τις ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες που ενδεχόμενα να επικρατήσουν, συμβάλλουν στην εκδήλωση επιδημίας. Συνεπώς, η παραγωγή των καπνοφυτειών θα μειωθεί, τόσο στην παραγωγή όσο και ποιοτικά. Για τον περιορισμό των δυσμενών επιπτώσεων στην παραγωγή, απαιτείται η εφαρμογή των κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων στον κατάλληλο χρόνο, ώστε να διατηρηθεί ο πληθυσμός των αφίδων κάτω από το επίπεδο οικονομικής ζημιάς.

Abstract

The aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), known also as the green peach aphid, is an exceptionally polyphagous species since it affects more than 400 plant species in all continents. Besides the serious damage it causes, it is regarded as one of the most effective vectors of many plant viruses. By making surface probes for testing the cellular sap, which last only some seconds, it can transmit efficiently more than 100 plant viruses, including the non-persistent *Potato virus Y* (PVY).

In the present study, we investigated the transmission efficiency of the necrotic isolate of *Potato Virus Y* apterous aphids of *M. persicae* in different varieties of tobacco plants. The aphid colonies were grown up in the laboratory under special conditions. The two aphid clones were from two different geographical areas: Meliki in Imathia prefecture and Lehonia in Magnesia prefecture. Morphometric and molecular studies of *M. persicae* populations coming from these two areas, have that the population coming from Meliki belongs to the subspecies *M. persicae nicotianae* which shows host specialization. Specifically, it colonizes *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). The population coming from Lehonia belongs to the taxon *M. persicae sensu stricto* (s. str.) which is polyphagous. It colonizes not only tobacco but other herbaceous host plants as well.

The virus transmission was studied in the laboratory. Viruliferous tobacco plants were the source plants, on which the virus was retained by mechanical transmission. Acquisition and transmission periods were controlled. Specifically, the virus acquisition time from the infected plant was 3 minutes while aphid retention time on healthy tobacco plants was 10 minutes. After virus infection of the plants by the aphids and in 15 days, the tobacco plants were tested with ELISA to detect PVY^N. The statistical analysis of the results showed that: a) both the specialized and the polyphagous taxa transmitted the necrotic isolate of PVY efficiently, and b) the factor variety does not play an important role in the transmission of virus, as soon as the aphids recognize the plant as host and transmit the virus.

It is worth pointing out the importance of the presence of *M. persicae nicotianae* and *M.persicae sensu stricto* in an area where tobacco plants grow. The specialization of the subspecies *M. persicae nicotianae* in tobacco plants and their acceptance on as host plants by *M.persicae sensu stricto* result in a fast grow of aphid populations. The high number of aphids in combination with its high infectious ability and the favorable conditions of the environment which may prevail, contribute to epidemic outbreaks. Therefore, tobacco plantations will be reduced not only in quantity but also in quality. To reduce the adverse implications in production, it is necessary to apply special techniques and methods at a suitable time to keep aphid populations below the level of economic damage.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής, είναι η αποτελεσματικότητα μετάδοσης του ιού Υ της πατάτας από άπτερα ενήλικα θυληκά άτομα του είδους *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae) σε 8 διαφορετικές ποικιλίες καπνού.

Συγκεκριμένα, έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης του ποσοστού μετάδοσης του ιού και της ύπαρξης ή όχι διαφοράς, μεταξύ του εξειδικευμένου στον καπνό τάξο *M. persicae nicotianae* που αποικίζει τον καπνό και του πολυφάγου *M. persicae sensu stricto* αλλά και για διαφορετικές ποικιλίες καπνού. Διερευνήθηκε δηλαδή, η συμβολή των άπτερων ατόμων στην εξάπλωση του ιού Υ της πατάτας ανάμεσα στις ποικιλίες και αυτό γιατί η γνώση της μολυσματικής ικανότητας των φορέων, καθιστά δυνατό τον έγκαιρο και αποτελεσματικό έλεγχο του ιού.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό ελεγχόμενο χρόνο πρόσληψης και μετάδοσης του ιού. Η πρόσληψη και η μετάδοση του ιού έγινε από και σε φυτά καπνού.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae) γνωστή και ως πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, ανήκει στην υπεροικογένεια Aphidoidea, της τάξης Hemiptera. Είναι ένα μικρόσωμο έντομο, με μαλακό σώμα, εξαιρετικά πολυφάγο και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών. Προτιμά κυρίως τους τρυφερούς βλαστούς και τα τρυφερά φύλλα των φυτών, όπου δημιουργεί αποικίες (van Emdem *et al.* 1969, Blackman & Eastop 1984).

Τρέφεται μυζώντας χυμό από τα φυτά και προκαλεί τη συστροφή των φύλλων. Τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματά του, ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων καπνιάς. Εκτός από την αξιόλογη ζημιά την οποία προκαλεί στα φυτά, θεωρείται και ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιών (Kennedy *et al.* 1962).

Ο ιός Υ ή ιός ράβδωσης της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY) είναι ένας από τους 100 περίπου ιούς φυτών που μπορούν να μεταδοθούν με την *M. persicae*. Αναφορές στη βιβλιογραφία καταδεικνύουν το είδος *M. persicae* ως τον πιο αποτελεσματικό φορέα του ιού, ακολουθούμενο από το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphididae) (Walsh *et al.* 2000).

Ο PVY ανήκει στην οικογένεια *Potyviridae*. Έχει όλες τις γενετικές πληροφορίες που χρειάζεται για να αναπαράγει τον εαυτό του, ωστόσο η αναπαραγωγή του προϋποθέτει την είσοδό του σε κάποιο κύτταρο ξενιστή. Το κύτταρο του παρέχει τα αναγκαία ένζυμα καθώς και την ενέργεια που χρειάζεται για να πολλαπλασιαστεί.

Η μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει με μηχανικό τρόπο και εμβολιασμό, ενώ σε συνθήκες αγρού μεταδίδεται κυρίως με τις αφίδες κατά μη έμμονο τρόπο. Ο PVY προσλαμβάνεται κυρίως από τις αφίδες-φορείς κατά τη διάρκεια μικρών και επιφανειακών νυγμάτων δοκιμασίας διάρκειας λίγων δευτερολέπτων και μπορεί να μεταδοθεί αμέσως μετά την πρόσληψη χωρίς να απαιτείται χρόνος επώασης (Κατής 2000).

Πρόκειται για έναν ευρέως διαδεδομένο και πολύ σημαντικό ιό των φυτών. Τα συμπτώματα που προκαλεί ποικίλουν κατά πολύ ανάμεσα στα καλλιεργούμενα είδη, τις ποικιλίες των φυτών και τις φυλές του ιού (Buchen & Osmond 1987).

Για την αντιμετώπισή του απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανίχνευση της παρουσίας του στα φυτά. Ο PVY μπορεί να ανιχνευτεί με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), με την οποία μπορούν επίσης να διαχωριστούν και οι φυλές του. Ευρεία εφαρμογή στην ανίχνευση του ιού Υ της πατάτας, έχει και η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.

Στην ELISA χρησιμοποιείται αντιορός με αντισώματα που αναγνωρίζουν των συγκεκριμένο ιό (αντιγόνο). Ανιχνεύοντας τη σύνδεση του αντισώματος και του ομόλογου αντιγόνου, συμπεραίνεται η ύπαρξη του ιού στο φυτικό δείγμα (Walsh *et al.* 2000).

1.2 Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer)

1.2.1 Ταξινόμική θέση

Το είδος *M. persicae* (Sulzer) ανήκει στο Ζωικό Βασίλειο και η ταξινομική του θέση είναι η παρακάτω:

Κλάση: **Insecta**

Υποκλάση: **Εφωπτερύγωτα**

Τάξη: **Hemiptera**

Υπεροικογένεια: **Aphidoidea**

Οικογένεια: **Aphididae**

Υπάρχουν περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους ενώ το κοινό όνομα του *M. persicae* είναι πράσινη αφίδα της ροδακινιάς. Στον αγρότη και στο μέσο άνθρωπο, είναι γνωστή με τα κοινά ονόματα μελίγκρα, ψύλλος, ψείρα.

1.2.2 Μορφολογία ενηλίκου

Οι αφίδες του *M. persicae* (Hemiptera, Aphididae) είναι μικρού μεγέθους έντομα (περίπου 1,5 - 2,5 mm το μήκος των άπτερων θηλυκών), με μαλακό σώμα, σχήματος ωοειδές και πεπλατυσμένο. Το κεφάλι, ο θώρακας και η κοιλία, τις περισσότερες φορές είναι ευδιάκριτα με γυμνό οφθαλμό. Έχουν λεπτά πόδια, αρθρωτούς ταρσούς και κεραίες που αποτελούνται από 3-6 άρθρα. Στα νώτα του 5^{ου} κοιλιακού δακτυλίου η *M. persicae* έχει ένα ζεύγος σωληνόμορφων αποφύσεων που λέγονται σίφωνες ή κεράτια και στην άκρη της κοιλιάς μία απόφυση που λέγεται ουρίτσα ή ουρά (cauda). Η ουρίτσα είναι στενόμακρη, μήκους 0,2 mm και με τρία ζεύγη τριχών. Οι σίφωνες είναι λεπτοί και μακριοί, μήκους 0,4 mm αλλά δεν ξεπερνούν την άκρη της ουρίτσας. Είναι οι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγερμού. Όταν η αφίδα προσβληθεί από ένα αρπακτικό έντομο ή άλλο ζώο, εκλύει τις κηρώδους φύσεως φερομόνες, που προκαλούν διασπορά των γύρω της αφίδων. Στην κεφαλή υπάρχει ένα μακρύ ρύγχος, η βάση του οποίου βρίσκεται ανάμεσα στα πρόσθια ισχία. Σε ό,τι αφορά το χρωματισμό, υπάρχει μία διαφορο-

ποίηση ανάμεσα στα άτομα της *M. persicae*. Συγκεκριμένα, τα άπτερα άτομα έχουν σχεδόν ομοιόμορφο χρώμα με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου. Τα πτερωτά έχουν πράσινο χρώμα και φέρουν μία σκουρόχρωμη περιοχή επί του νωτιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα θηλυκά ωοτόκα έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα ενώ στην περιοχή της κοιλιάς διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα άτομα στο στάδιο του ενηλίκου έχουν πράσινη απόχρωση που προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο.

1.2.3 Ξενιστές

Η αφίδα *M. persicae* είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα φυτά προσβάλλει είδη των οικογενειών Rosaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Προσβάλλει αρκετές καλλιέργειες όπως: καπνός, πατάτα, ντομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι, λάχανο κ.α. Γεννά τα χειμερινά αυγά κυρίως στη ροδακινιά (*Prunus persica* L.) καθώς και σε άλλα πυρηνόκαρπα όπως *P. nigra*, *P. tanella*, *P. serotina* όπως επίσης και σε υβρίδια της ροδακινιάς και της αμυγδαλιάς (Τσανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).



Εικόνα 1. Αποικία αφίδων

1.2.4 Βιολογία

Το είδος είναι ετερόοικο, καθώς κατά τη διάρκεια του έτους μεταναστεύει από τον κύριο, στους δευτερεύοντες ξενιστές. Ο πρωτεύων ξενιστής τους είναι κυρίως η ροδακινιά, ενώ ποώδη φυτά αποτελούν τους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman 1971).

Έχει περισσότερες από πέντε γενιές το έτος και σε περιοχές όπου επικρατεί ψυχρός χειμώνας, διαχειμάζει ως χειμερινό αυγό στον φλοιό των κύριων ξενιστών. Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό άτομο, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή σε εσοχές των αδρών μερών του φλοιού. Τέλος χειμώνα με αρχές άνοιξης τα αυγά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά. Είναι τα λεγόμενα θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα. Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών στη ροδακινιά και στη συνέχεια πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά. Εκεί η μία παρθενογενετική γενιά ακολουθεί την άλλη. Το φθινόπωρο παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γενούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά αυγά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Γενότυποι που ακολουθούν την παραπάνω στρατηγική διαχείμασης, χαρακτηρίζονται ως ολοκυκλικοί (van Emdem et.al. 1969, Blackman 1971, 1974).

Σε περιοχές με ηπιότερο χειμώνα καθώς και σε προστατευμένες περιοχές με πιο βαρύ χειμώνα, επικρατούν οι ανολοκυκλικοί κλώνοι οι οποίοι δεν έχουν τη δυνατότητα παραγωγής σεξουαλικών μορφών. Διαχειμάζουν και αναπαράγονται με παρθενογενετικές μορφές σε αυτοφυή φυτά ή σε χειμερινές καλλιέργειες (van Emdem et.al. 1969, Blackman 1971, 1974).

Επίσης υπάρχουν οι ανδροκυκλικοί και οι ενδιάμεσοι κλώνοι που χρησιμοποιούν και τις δύο στρατηγικές διαχείμασης. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή σε χειμερινές καλλιέργειες, και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (van Emdem et.al. 1969, Blackman 1971,

1974). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι γενούν την ίδια εποχή πολλά άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θυληκά και λίγα αρσενικά και «ενδιάμεσα» πτερωτά. Τα «ενδιάμεσα» πτερωτά παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και μικρό αριθμό ωοτόκων θυληκών (Blackman 1971, 1972).

Στις περιοχές της Ελλάδας έχουν καταγραφεί και οι τέσσερις στρατηγικές διαχείμασης της *M. persicae*. Ωστόσο, βρέθηκε μια γεωγραφική διαφοροποίηση στο ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων, που συνδέθηκε με την αφθονία του κύριου ξενιστή. Συγκεκριμένα, στην κεντρική Μακεδονία, όπου η καλλιέργεια της ροδακινιάς είναι κυρίαρχη, το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων ξεπερνά το 50% και φθάνει σε μερικές περιπτώσεις σε 100%. Στην ανατολική Μακεδονία, οι ολοκυκλικοί κλώνοι είναι επίσης συχνοί. Αντίθετα, στη νότια και στη βορειοανατολική Ελλάδα, όπου ο κύριος ξενιστής δεν αφθονεί, το ποσοστό των ολοκυκλικών κλώνων είναι πολύ μικρότερο και κυμαίνεται μεταξύ 0-33% (Margaritopoulos et.al. 2003).

Με την ποικιλία μορφών (όπως παρθενογενετικά θυληκά, ωοτόκα κ.α.), τρόπου διαχείμασης, εναλλαγή ξενιστή και τροφική εξειδίκευση που παρουσιάζουν, οι αφίδες μπορούν να αποφεύγουν τις δυσμενείς για την επιβίωσή τους συνθήκες και να διαιωνίζονται (Shaposhnikov 1985).



Εικόνα 2. Πτερωτό άτομο αφίδας



Εικόνα 4. Αποικία ρόδινου κλώνου αφίδας



Εικόνα 3. Αποικία πράσινου κλώνου αφίδας

1.2.5 Ζημιές

Η *M. persicae* προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές των τρυφερών βλαστών και τα τρυφερά φύλλα για να τραφεί. Με τα στιλέτα πραγματοποιεί νύγματα στον ενδοκυτταρικό χώρο και συγκεκριμένα στο φλοίοωμα, από όπου αφαιρεί μεγάλη ποσότητα χυμού. Το νύγμα προκαλεί συστροφή του φύλλου, πράγμα που προστατεύει το έντομο από το ψεκαστικό υγρό και δυσκολεύει την καταπολέμησή του, όταν δεν γίνει έγκαιρα, δηλαδή προτού συστραφούν τα φύλλα. Επίσης, τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα του εντόμου ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την καπνιά και τα μυρμήγκια που προστατεύουν τις αφίδες διώχνοντας τα αφιδοφάγα έντομα. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά την οποία προκαλεί στα φυτά, η αφίδα θεωρείται ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς πολλών ιών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά πάνω από 100 ιούς φυτών (Kennedy *et.al.* 1962). Μεταδίδει τόσο έμμονους όσο και μη έμμονους ιούς οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

ΙΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
Ευλογιά της δαμασκηνιάς (<i>Plum pox virus</i>)	Μη- έμμονος
Κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , ZYMV)	Μη- έμμονος
Μωσαϊκό των τεύτλων (<i>Beet mosaic virus</i> , BtMV)	Μη- έμμονος
Μωσαϊκό μαρουλιού (<i>Lettuce mosaic virus</i> , LMV)	Μη- έμμονος
Αφιδομεταδιδόμενος ίκτερος κολοκυνθοειδών (<i>Cucurbit aphid- borne yellows virus</i> , CABYV)	Έμμονος
Ίκτερος τεύτλων (<i>Beet yellows virus</i> , BYV)	Ημί- έμμονος
Καρούλιασμα φύλλων πατάτας (<i>Potato leafroll virus</i> , PRLV)	Έμμονος
Μωσαϊκό αγγουριάς (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV)	Μη- έμμονος
Κίτρινη στίξη της κολοκυθιάς (<i>Zucchini yellow fleck virus</i> , ZYFV)	Μη- έμμονος
Ιός Y της πατάτας (<i>Potato virus Y</i> , PVY)	Μη- έμμονος
Ιός A της πατάτας (<i>Potato virus A</i> , PVA)	Μη- έμμονος
Μωσαϊκό μηδικής (<i>Alfalfa mosaic virus</i> , AMV)	Μη- έμμονος

Πίνακας 1. Ιοί που μεταδίδονται με το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) (Blackman & Eatop 1984, Bruht et al. 1996)

1.2.6 Καταπολέμηση

Οι συνήθως πυκνοί πληθυσμοί της αφίδας, ο μεγάλος αριθμός γενεών, το έτος και η μετάδοση ιών στα φυτά, κατατάσσουν το έντομο ανάμεσα στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Το ότι με φυσικές συνθήκες τα άτομα του *M. persicae* δεν καταστρέφουν τη φυτική παραγωγή, οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στους πολλούς και αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς τους. Ανάμεσα στους αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς της είναι αρπακτικά Νευρόπτερα των οικογενειών Chrysopidae και Hemerobiidae, αρπακτικά Κολεόπτερα της οικογένειας Coccinellidae, όπως *Adalia bipunctata* και *Coccinella septempunctata*, αρπακτικά Δίπτερα της οικογένειας Syrphidae και παρασιτοειδή Υμενόπτερα των οικογενειών Braconidae, Chalcididae και Proctotrupidae. Εντομοπαθογόνοι μύκητες του γένους *Entomophthora* είναι αποτελεσματικοί σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, αλλά όχι στις παραμεσόγειες περιοχές (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Όσο είναι δυνατόν, πρέπει να διατηρούνται στις καλλιέργειες οι αποτελεσματικοί φυσικοί εχθροί των αφίδων, ώστε να μην χρειάζονται ψεκασμοί με εντομοκτόνα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Ωστόσο, η διαχείριση των πληθυσμών της βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών ουσιών, ιδιαίτερα κλασικών οργανικών εντομοκτόνων. Η αποτελεσματικότητα αντιμετώπισης των πληθυσμών τους όμως ελαττώνεται συνεχώς εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα έντομα αυτά και της αύξησης του κόστους παραγωγής, λόγω επανειλημμένων εφαρμογών. Επιπρόσθετα, οι χημικές επεμβάσεις εμπλέκουν κι άλλους παράγοντες, όπως οι περιβαλλοντικοί και οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία, καθώς και δυσμενείς επιπτώσεις σε ωφέλιμα έντομα ή στο ίδιο το προϊόν με την υποβάθμισή του λόγω παρουσίας υπολειμμάτων των εντομοκτόνων. Οι σύγχρονες τάσεις απαιτούν τη διαχείριση των εχθρών στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης Εχθρών (IPM). Στην IPM συνυπολογίζονται περιβαλλοντικοί και οικονομικοί παράγοντες παράλληλα με τη χρήση διάφορων μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στη δράση των φυσικών εχθρών και την εφαρμογή, όπου απαιτείται, περιβαλλοντικά ήπιων εντομοκτόμων ουσιών (π.χ. imidacloprid). Ο έλεγχος των αφίδων πρέπει να συμπεριλαμβάνει όχι μόνο την ελάττωση των πληθυσμών, αλλά και την προ-

στασία των φυτών από προσβολές αφιδομεταδιδόμενων ιών που προκαλούν ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος (Papadopoulos et.al. 2004). Πειραματική μελέτη των Papadopoulos et.al. (2004), έδειξε ότι τα νέα, φιλικά προς το περιβάλλον εντομοκτόνα (imidacloprid, acetamiprid, py-metrozine, thiamethoxam), προστατεύουν την καλλιέργεια του καπνού για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μάλιστα η αποτελεσματικότητά τους βελτιώνεται όταν γίνεται εφαρμογή υπερμικρού όγκου (U.L.V.) με χρήση ηλεκτροστατικού ψεκαστήρα. Επίσης, η χρήση εντομοκτόνων ουσιών (π.χ. imidacloprid, thiamethoxam) ταυτόχρονα με το νερό εγκατάστασης της φυτείας μετά τη μεταφύτευση, αποδείχθηκε ικανοποιητική εναντίον των αφίδων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα βιοεντομοκτόνα (π.χ. *Verticillium lecanii*) είναι πολλές φορές αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των αφίδων, αλλά μόνο σε ιδιαίτερες συνθήκες, όπως όταν επικρατούν υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας. Άλλες πρακτικές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης, παρέχοντας μάλιστα ικανοποιητική προστασία από τις αφίδες, είναι η εφαρμογή του συστήματος επίπλευσης (floating system) με καλυμμένα ανοίγματα στα σπορεία και η κάλυψή τους με ειδικά δίκτυα εντομοστεγανότητας.



Εικόνα 3. Προσβολή «φούντας» από αφίδες



Εικόνα 4. Προσβολή φύλλων καπνού από αφίδες



Εικόνα 5. *Coccinella septempunctata*,
φυσικός εχθρός των αφίδων

1.3 Ο ιός Υ της πατάτας (*Potato virus Y* ή *PVY*)

Οι ιοί (viruses, ενικός: virus) των φυτών, είναι μία ιδιαίτερη κατηγορία έμβιων όντων. Σε αντίθεση με τα άλλα μεταδιδόμενα παθογόνα των φυτών (βακτήρια, ρικκέτσίες, μυκοπλάσματα), οι ιοί δεν είναι ζωντανοί οργανισμοί. Επίσης έχουν πιο απλή χημική σύνθεση και σημαντικά μικρότερο μέγεθος (Κυριακοπούλου 1996).

Σύμφωνα με τον ορισμό του Mathews (1991), «ο ιός είναι μια σειρά από ένα ή περισσότερα μόρια αναπαραγόμενων νουκλεϊκών οξέων, κατά κανόνα εγκλεισμένα εντός προστατευτικού πρωτεϊνικού ή λιποπρωτεϊνικού περιβλήματος, η οποία είναι ικανή να οργανώσει την αναπαραγωγή του εαυτού της εντός κατάλληλων ξενιστών κυττάρων».

Ο συνολικός αριθμός των γνωστών μέχρι σήμερα ειδών των ιών των φυτών υπολογίζεται σε 800 περίπου. Είναι οι ιοί των ανώτερων φυτών και ιδιαίτερα των αγγειοσπέρμων, έχουν όμως βρεθεί ιοί και στα γυμνόσπερμα, καθώς και στα κατώτερα φυτά. Ανάμεσά τους συμπεριλαμβάνεται και ο ιός Υ της πατάτας (*Potato virus* ή *PVY*) (Κυριακοπούλου 1996).

Ο *PVY* ανήκει στην οικογένεια *Potyviridae* (Walsh et al 2000). Τα μέλη της διαιρούνται, ανάλογα με το μέγεθος των ιοσωματίων και του γονιδιώματος, την οργάνωση του γονιδιώματος και τον τύπο του φορέα σε έξι γένη: *Potyvirus* (μετάδοση με αφίδες), *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus* και το γένος *Tritimovirus* (Κατής 2000). Το γένος *Potyvirus* είναι μια μεγάλη και οικονομικά πολύ σημαντική ομάδα ιών. Τα μέλη του γένους προκαλούν σοβαρές ασθένειες. Είναι η πιο άφθονη ομάδα ιών του φυτού της πατάτας (Perez et al. 1995). Τυπικό μέλος του γένους *Potyvirus* είναι ο ιός Υ της πατάτας.

Άλλα μέλη του γένους είναι: ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (*Bean common mosaic virus*, BCMV), ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV), ο ιός του μωσαϊκού των τεύτλων (*Beet mosaic virus*, BtMV), ο ιός των λεπτών φύλλων του καρότου (*Carrot thin leaf virus*, CTLV), ο ιός του μωσαϊκού του σέλινου (*Celery mosaic virus*, CeMV), ο ιός της κίτρινης ράβδωσης του πράσου (*Leek yellow stripe virus*,

LYSV), ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*, LMV), ο ιός του κίτρινου νανισμού του κρεμμυδιού (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), ο ιός της ευλογιάς της δαμασκηιάς (*Plum pox virus*, PPV), ο ιός του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά (*Pea seed borne mosaic virus*, PSdMV), ο ιός της ποικιλόχρωσης της πιπεριάς (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV), ο ιός A της πατάτας (*Potato virus A*, PVA), ο ιός του μωσαϊκού της σόγιας (*Soybean mosaic virus*, SoMV), ο ιός του μωσαϊκού του σακχαροκάλαμου (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV), ο ιός της ποικιλοχλώρωσης των νεύρων του καπνού (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV), ο ιός του μωσαϊκού του γογγυλιού (*Turnip mosaic virus*, TuMV), ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (*Zucchini yellow mosaic virus c*, ZYMV), ο ιός του μωσαϊκού της καρπουζιάς (*Watermelon mosaic virus*, WMV) (Κατής 2000).

Ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY), όπως και όλοι οι φυτικοί ιοί, έχει κωδικοποιημένες σε νουκλεϊκό οξύ όλες τις πληροφορίες που χρειάζεται για να αναπαράγει τον εαυτό του. Η αναπαραγωγή του όμως γίνεται στο κυτταρόπλασμα κάποιου κυττάρου ξενιστή που του παρέχει τα αναγκαία ένζυμα για να πολλαπλασιαστεί. Το κύτταρο επίσης παρέχει τα μικρομόρια (πυρίνες, πυριμιδίνες, αμινοξέα), τα ριβοσώματα, τους RNA-μεταφορείς (transfer-RNA) καθώς και την ενέργεια, που χρειάζεται για τη σύνθεση των συστατικών του ιού (Γεωργόπουλος 1984).

Το νουκλεϊκό οξύ του PVY είναι το RNA. Πρόκειται για ένα μακρύ μονόκλωνο RNA γονιδίωμα το οποίο βρίσκεται σε ιοσώματα (Walsh *et al* 2000). Τα ιοσώματα είναι νηματοειδή, δεν είναι περιτυλιγμένα, συνήθως είναι εύκαμπτα με μήκος 684nm ή 730nm και 11nm πλάτος. Περιέχουν 5-8% νουκλεϊκό οξύ το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Το πρωτεϊνικό καψίδιο περιέχει 92-95% πρωτεΐνη. Ο ρόλος της πρωτεΐνης είναι ένας ρόλος προστατευτικός και ρόλος αντιγονικής εξειδικεύσεως. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη του καψιδίου δεσμεύεται στα στοματικά μόρια των αφίδων φορέων του ιού, με τη μεσολάβηση μιας ιογενούς κωδικοποιημένης πρωτεΐνης, της βοηθητικής πρωτεΐνης η οποία παράγεται στο μολυσμένο ξενιστή και έτσι καθίσταται δυνατή η μετάδοση του ιού σε άλλα φυτά ξενιστές (Collar & Fereres 1998). Τέλος, το γονιδίωμα του PVY έχει κρυμμένο αζονικό κανάλι, 2-3nm διάμετρο και κρυμμένο βασικό έλικα, του οποίου η κατακόρυφη ταλάντωση είναι 3,3 nm (Buchen & Osmond 1987).

1.3.1 Φυλές

Αρκετές ομάδες φυλών μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με τα γενικά και τυπικά συμπτώματα που προκαλεί ο ιός στα φυτά *Nicotiana tabacum*, *Physalis floridana*, *Solanum tuberosum* αλλά και σε άλλες καλλιέργειες. Ωστόσο, η σημαντικότερες ομάδες είναι:

- **Ομάδα του ιού Y^0 της πατάτας** (κοινή φυλή). Προκαλεί κυρίως σοβαρή ράβδωση ή τραχύτητα στα φύλλα της πατάτας, γενική νέκρωση στο φυτό *Physalis floridana* και γενική κηλίδωση στον καπνό.
- **Ομάδα του ιού Y^N της πατάτας** (νέκρωση των ακροπεταλίων του καπνού). Προκαλεί σοβαρή νέκρωση των νεύρων στον καπνό, γενική κηλίδωση στο φυτό *Physalis floridana* και πολύ ήπια κηλίδωση σε όλες τις καλλιέργειες.
- **Ομάδα του ιού Y^C της πατάτας** (φυλή ραβδωτής χάραξης, συμπεριλαμβανομένου του ιού C της πατάτας). Ο ιός C της πατάτας δεν μπορεί να μεταδοθεί μόνος του από την *M. persicae*, αλλά άλλες φυλές σε αυτήν την ομάδα μπορούν. Πολλές καλλιέργειες είναι υπερευαίσθητες σε αυτήν την ομάδα. Ευπαθής καλλιέργειες μπορεί να παρουσιάσουν μωσαϊκό ή ποικιλοχλώρωση. Τα συμπτώματα στα φυτά *Nicotiana tabacum*, *Physalis floridana*, είναι παρόμοια με αυτά που προκαλεί η φυλή Y^0 (Bokx & Huttinga 1981).

1.3.2 Γεωγραφική διανομή

Ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y* ή PVY) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εντομομεταδιδόμενους ιούς της πατάτας, όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και διεθνώς. Πιθανότατα εξαπλώνεται παγκοσμίως σε περιοχές όπου μεγαλώνει η πατάτα και σε υπαίθριες καλλιέργειες πιπεριάς, καπνού και ντομάτας σε θερμότερες χώρες. Οι φυλές του Y^0 εξαπλώνονται παγκόσμια, οι φυλές του Y^N υπάρχουν στην Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, τμήματα της Αφρικής και της Νότιας Αμερικής, οι φυλές του Y^C συμπεριλαμβανομένου και του ιού C της πατάτας παρουσιάζονται πι-

θανότατα στην Αυστραλία, την Ινδία και κάποια τμήματα του Ηνωμένου Βασιλείου και της Ηπειρωτικής Ευρώπης (Buchen & Osmond 1987).

1.3.3 Ξενιστές

Ο κύκλος των ξενιστών περιορίζεται κυρίως στην οικογένεια Solanaceae, παρόλο που κάποια είδη των οικογενειών Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae και Leguminosae είναι επίσης ευπαθή (Perez *et al.* 1995). Ο PVY μολύνει κυρίως τα φυτά της οικογένειας Solanaceae, όπως καπνός, ντομάτα, πιπεριά και πατάτα και έχει σημαντική επίδραση στην πατάτα και σε άλλα φυτά της οικογενείας, προκαλώντας ποιοτικές αλλά και ποσοτικές ζημιές. Έχουν αναφερθεί απώλειες σοδειάς της τάξεως του 10-80% στην πατάτα και μαζί με τον ιό του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας και με τον ιό X της πατάτας λογοδοτούν για ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής. Τέλος, ζιζάνια όπως το *Solanum atropurpureum* και άλλα είδη *Solanum* μπορούν επίσης να μολυνθούν από τον ιό και να ενεργούν ως σημαντικές πηγές διατήρησης και μετάδοσής του (Walsh *et al.* 2000).



Εικόνα 6. Φύλλα πατάτας προσβεβλημένα από τον ιό PVY

1.3.4 Συμπτώματα

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο ιός Υ της πατάτας ποικίλουν κατά πολύ ανάμεσα στα καλλιεργούμενα είδη, στις ποικιλίες των φυτών και τις φυλές του ιού. Για παράδειγμα τα συμπτώματα του PVY⁰ στην πατάτα περιλαμβάνουν σοβαρή ράβδωση ή τραχύτητα ενώ ο PVY^N προκαλεί κυρίως ήπια ποικιλοχλώρωση. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι οι επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες. Ωστόσο, τυπικά συμπτώματα είναι η ποικιλοχλώρωση των φύλλων, διαφάνεια των νευρώσεων, μωσαϊκό, ζάρωμα, τραχύτητα και μερικές φορές παραμόρφωση, νανισμός, εύθραυστο φύλλωμα και νέκρωση. Οι μικτές μολύνσεις από τον ιό Υ της πατάτας και τον ιό Χ της πατάτας, δημιουργούν σοβαρά συμπτώματα που οδηγούν σε «μωσαϊκό rugose». Στα λουλούδια μπορεί να συμβεί καταστροφή του χρώματος (Walsh *et al.* 2000, Buchen & Osmond 1987).

Συνηθισμένες ανατομικές και φυσιολογικές ανωμαλίες που διαπιστώνονται στα μολυσμένα από τον ιό φυτά, είναι η μείωση της χλωροφύλλης, ο αυξημένος ρυθμός αναπνοής, η εμφάνιση εγκλείσιων στα μολυσμένα κύτταρα και κρύσταλλοι στον πυρήνα, που δεν υπάρχουν στα αμόλυντα φυτά. Επίσης, υπάρχουν ιοσώματα στην επιδερμίδα, στο κυτταρόπλασμα και στο κενοτόπιο του κυττάρου και τα μιτοχόνδρια συχνά περιβάλλονται από ίνες με διάμετρο από 9-10nm (Buchen & Osmond 1987).



Εικόνα 9. Φυτό καπνού προσβεβλημένο από τον ιό PVY

1.3.5 Μετάδοση

Ο ιός Υ της πατάτας μεταδίδεται με μηχανικό τρόπο και με εμβολιασμό, ενώ σε συνθήκες χωραφιού μεταδίδεται κυρίως από τις αφίδες (Hemiptera, Aphididae). Ο ιός Υ δεν χρειάζεται βοηθητικό ιό για την μετάδοσή του από τον φορέα του, αντίθετα, μπορεί να βοηθήσει τη μετάδοση ενός άλλου ιού (μωσαϊκού τύπου aucuba της πατάτας, Potato aucuba mosaic virus). Πειραματικά στοιχεία αναφέρουν μετάδοση και από αλευρώδεις, μύκητες καθώς και δίπτερα (Buchen & Osmond 1987).

Ο PVY μεταδίδεται κατά μη έμμοιο τρόπο. Δηλαδή προσλαμβάνεται από τους φορείς κατά τη διάρκεια ενδοκυτταρικών διεισδύσεων στην επιδερμίδα και στο μεσόφυλλο. Οι ενδοκυτταρικές διεισδύσεις από τις αφίδες είναι πολύ σύντομες και συχνές. Συμβαίνουν κατά μέσο όρο σε διαστήματα του ενός λεπτού και διαρκούν περίπου 5-7 δευτερόλεπτα. Για τα άλλα ημίπτερα, αυτά τα επιφανειακά νύγματα δοκιμών κυτταρικού χυμού, συμβαίνουν πολύ λιγότερο συχνά από ότι στις αφίδες, αν και μπορεί να διαρκέσουν περισσότερο. Το προαναφερόμενο πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι αφίδες δεν έχουν όπως τα άλλα ημίπτερα, χημικοδραστικά αισθητήρια όργανα στους tarsούς ή στην κορυφή του χείλους και κατά συνέπεια, η κατάποση του κυτταρικού χυμού δια μέσου του τροφικού αγωγού είναι αναγκαία για να ελέγξουν την καταλληλότητα ή μη του φυτού ως ξενιστή και να εντοπίσουν την ευνοϊκή θέση πάνω στον ξενιστή τους. Με αυτή την διαδικασία, οι αφίδες μπορούν να προσλάβουν τους μη έμμοιους ιούς πολύ αποτελεσματικά (Ferreira & Collar 2001). Μετά την πρόσληψη, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί αμέσως, χωρίς να απαιτείται χρόνος επώασης. Οι αφίδες διατηρούν τη μολυσματικότητά τους για λίγα λεπτά έως και 24 ώρες, μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό (Perez et al. 1995).

Αποδείχθηκε πως ο PVY και γενικότερα οι μη έμμοιοι ιοί, μεταδίδονται πιο εύκολα από πτερωτά είδη αφίδων που δεν αποικίζουν την καλλιέργεια απ' ότι από άπτερα είδη που αποικίζουν την εκάστοτε καλλιέργεια (Ferreira et al. 1993). Οι πτερωτές αφίδες προσανατολίζονται οπτικά προς τα φυτά. Ελκύονται στο φως με πορτοκαλί, κίτρινα και πράσινα μήκη κύματος (>500nm). Η διαφορά ανάμεσα στα πράσινα φυτά και στο σκούρο έδαφος φαίνεται να είναι

ιδιαίτερα ελκυστική στις αφίδες. Ο Brook (1968, 1973) παρατήρησε ότι οι περισσότερες αφίδες προσεγγίζουν πιο εύκολα τις καλλιέργειες στις οποίες οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών είναι μεγάλες, παρά τις καλλιέργειες με μικρές αποστάσεις φύτευσης- σποράς, και απέδωσε τη διαφορά στο μεγαλύτερο αριθμό αντίθεσης φυτού/ εδάφους που υπήρχε στις καλλιέργειες με μεγαλύτερες διατάξεις στο χώρο.

Όταν οι αφίδες αποικίζουν ένα χωράφι, η προσβολή τείνει να ξεκινά από τις περιφέρειες, ειδικά όταν οι περιφέρειες σχετίζονται με την κατεύθυνση του αέρα και βρίσκονται κοντά σε κατασκευές, όπως φράχτες, όρια δασικής ανάπτυξης και κτίρια. Συνεπώς, οι περιπτώσεις πολλών ιών που μεταδίδονται από αφίδες είναι περισσότερο συχνές στις περιφέρειες χωραφιών, ειδικά αν η πηγή και των αφίδων και του ιού είναι εκτός της καλλιέργειας (DiFonso 1995).

Τουλάχιστον 53 διαφορετικά είδη αφίδων συγκαταλέγονται στους φορείς του ιού της ράβδωσης της πατάτας (Πίνακας 2). Από αυτούς, το είδος *Myzus persicae* αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό, ακολουθούμενο απ' το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Walsh et al. 2000).

Η διαφορετική ικανότητα μετάδοσης των αφίδων φορέων του PVY, οφείλεται κυρίως στη διαφορετική συχνότητα πραγματοποίησης επιφανειακών νυγμάτων. Οι Powell et al. (1992) διαπίστωσαν πως υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα των ενδοκυτταρικών διεισδύσεων και τη μετάδοση του ιού Y της πατάτας, όταν συγκρίθηκε η συμπεριφορά διαφορετικών ειδών αφίδων, κατά τη διάρκεια εκτέλεσης νυγμάτων σε φυτά πιπεριάς. Τα είδη που αποικίζουν την πιπεριά (*M. persicae* και *A. gossypii*), δείχνουν μια τυπική πρώιμη συμπεριφορά δοκιμής κυτταρικού χυμού, ενώ τα είδη που δεν αποικίζουν την πιπεριά (*S. Avenae* και *R. radī*), έχουν την τάση να κινούνται κατά μήκος του φύλλου. Αλλά και όταν πραγματοποιούν νύγματα, αυτά είναι πολύ σύντομα, χωρίς να λαμβάνει χώρα η διαδικασία της κατάποσης, και συνεπώς οι πιθανότητες για πρόσληψη του ιού είναι πολύ μικρές. Επιπλέον, πολλά άτομα των ειδών *S. avenae* και *R. radī*, δεν χρειάστηκε να πραγματοποιήσουν επιφανειακά νύγματα δοκιμής κυτταρικού χυμού του φυτού για να το αποκλείσουν ως ξενιστή τους. Οσφρητικοί υποδοχείς στις κεραίες, τους ταρσούς ή στην άκρη του στιλέτου τους, μπορεί να είναι αρκετά για τον προσδιορισμό του φυτού ως μη κατάλληλο για αποικισμό (Collar & Fereres 1998, 2001).

Οπωσδήποτε, μολονότι αυτά τα είδη δεν είναι αποτελεσματικοί φορείς του PVY, δεν πρέπει να αποκλείονται από επιδημιολογικής άποψης, ως ενδεχόμενοι φορείς σε αγρούς με πιπεριές (Perez et al. 1995). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι, και η βοηθητική πρωτεΐνη του PVY συμβάλλει στην αποτελεσματική μετάδοση μέσω των αφίδων. Συγκεκριμένα, η βοηθητική πρωτεΐνη και τα ιοσώματα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με συστατικά του σιέλου και διαφορές στη σύνθεση του σιέλου των διαφόρων ειδών, μπορεί να καταλήξει σε διαφοροποίηση του ποσοστού μετάδοσης (Fereres & Collar 2001).

Συνεπώς, η επιδημιολογία του PVY διαφοροποιείται ανάμεσα στις καλλιεργούμενες περιοχές καθώς και μεταξύ των ετών στην ίδια περιοχή καλλιέργειας και εξαρτάται από τα είδη αφίδων που παρουσιάζονται, το σχετικό μέγεθος των πληθυσμών τους, τη συμπεριφορά αναζήτησης ξενιστή που εκδηλώνουν και την τροφική δραστηριότητα που επιδεικνύουν, καθώς και τις καλλιεργητικές πρακτικές που εφαρμόζονται στην κάθε περιοχή (DiFonzo, 1995).

Είδος	Επίσημο όνομα	Επίσημο όνομα
1	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
2	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
3	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
4	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
5	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
6	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
7	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
8	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
9	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
10	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
11	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
12	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
13	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
14	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
15	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
16	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
17	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
18	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
19	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
20	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
21	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
22	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
23	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
24	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
25	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
26	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
27	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
28	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
29	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
30	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
31	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
32	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
33	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
34	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
35	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
36	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
37	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
38	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
39	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
40	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
41	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
42	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
43	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
44	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
45	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
46	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
47	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
48	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
49	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
50	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
51	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
52	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
53	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
54	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
55	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
56	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
57	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
58	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
59	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
60	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
61	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
62	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
63	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
64	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
65	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
66	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
67	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
68	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
69	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
70	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
71	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
72	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
73	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
74	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
75	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
76	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
77	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
78	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
79	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
80	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
81	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
82	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
83	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
84	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
85	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
86	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
87	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
88	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
89	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
90	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
91	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
92	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
93	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
94	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
95	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
96	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
97	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
98	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
99	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>
100	<i>Myndus persici</i>	<i>Myndus persici</i>

<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Capitophorus elaeagni</i>	<i>Metapolophium dirtho- dum</i>
<i>Acyrtosiphon primulae</i>	<i>Capitophorus hippophaes</i>	<i>Metapolophium festucae</i>
<i>Aphis spp.</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	<i>Myzaphis rosarum</i>
<i>Aphis abbreviata</i>	<i>Cavariella pastinacea</i>	<i>Myzus cerasi</i>
<i>Aphis citricola</i>	<i>Cryptomyzus ballotae</i>	<i>Myzus certus</i>
<i>Aphis craccinora</i>	<i>Cryptomyzus galeaopsi- dis</i>	<i>Myzus circimflexus</i>
<i>Aphis fabae</i>	<i>Cryptomyzus ribis</i>	<i>Myzus ligustri</i>
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Drepanosiphum pla- tanoides</i>	<i>Myzus myosotidis</i>
<i>Aphis nastustii</i>	<i>Dysaphis spp.</i>	<i>Phorodom humuli</i>
<i>Aphis pomi</i>	<i>Hyadaphis erysimi</i>	<i>Rhopalosiphonimus staphyleae tulipaellus</i>
<i>Aphis rhamni</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	<i>Rhopalosiphum insertum</i>
<i>Aphis sambuci</i>	<i>Hyalopterus pruni</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
<i>Aulacorthum circimflexus</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
<i>Aulacorthum solani</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Schizaphis graminum</i>
<i>Brachycaudus spp.</i>	<i>Macrosiphum gei</i>	<i>Sitobion avenae</i>
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	<i>Macrosiphum solanifoli</i>	<i>Sitobion fragariae</i>
<i>Capitophorus braggii</i>	<i>Metapolophium albidum</i>	<i>Uroleucon spp.</i>

Πίνακας 2. Είδη αφίδων, φορείς του PVY

1.3.6 Ανίχνευση

Οι αρχές στις οποίες βασίζονται οι διαγνωστικές μέθοδοι του ιού Υ της πατάτας και των υπόλοιπων φυτικών ιών, στηρίζονται στις βιολογικές τους αντιδράσεις, δηλαδή στα συμπτώματα που προκαλούν στους ξενιστές τους, στην άμεση παρτήρηση των σωματιδίων τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στην ανίχνευση των επιμέρους συστατικών των σωματιδίων τους, δηλαδή της πρωτεΐνης καψιδίου ή φακέλου του ιού και του νουκλεοξέος του. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται ορολογικές μέθοδοι (Κυριακού 1996).

Συγκεκριμένα, ο PVY μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοενζυμική ανάλυση (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) των μολυσμένων φυτών και με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης σε συνδυασμό με αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Με RT-PCR μπορούν επίσης να διαχωριστούν και οι φυλές του ιού (Walsh *et al.* 2000).

1.3.7 Έλεγχος του PVY

Ο ιός Υ της πατάτας, ως ιός μεταδιδόμενος με μη έμμοιο τρόπο, είναι δύσκολο να ελεγχθεί, αφού τα μεταναστευτικά και μη μεταναστευτικά είδη αφίδας μπορούν να τον μεταδώσουν ακόμα και μετά από σύντομα νύγματα διατροφής στα μολυσμένα φυτά (Katis *et al.* 1998).

Η μείωση του αριθμού των φορέων του ιού Υ της πατάτας συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση εντομοκτόνων, εναντίον των μεταναστευτικών αφίδων που μεταδίδουν τους ιούς από τα φυτά πηγές σε φυτά εντός της καλλιέργειας. Ωστόσο, γενικά, τα εντομοκτόνα δεν μπορούν να ελέγξουν τις μεταναστευτικές πτερωτές αφίδες που μεταδίδουν τους μη έμμοιους ιούς (συμπεριλαμβανομένου του ιού Υ της πατάτας). Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στον πατατόσπορο δεν μπορούν να εμποδίσουν τη διαδικασία σταδιακής δημιουργίας των πιθανών φορέων αφίδων σε γειτονικές καλλιέργειες και ζιζάνια και δεν μπορούν να θανατώσουν τις εισερχόμενες ιοφόρες αφίδες τόσο γρήγορα

ώστε να εμποδίσουν τη μετάδοση του ιού Υ της πατάτας, αφού και ένα απλό νύγμα δοκιμής μπορεί να μεταδώσει τον ιό. Επιπλέον, τα εντομοκτόνα αυξάνουν την κίνηση των αφίδων μέσα στην καλλιέργεια και με την επανειλημμένη εφαρμογή οδηγούν σε επανεμφάνιση τον πληθυσμό των αφίδων. Η αύξηση του πληθυσμού των αφίδων και της κινητικής τους δραστηριότητας, συμβάλλουν στη μεγαλύτερη διάδοση του ιού Υ της πατάτας (DiFonzo, 1995).

Οι κύριες μέθοδοι ελέγχου του PVY είναι:

1. Η αποφυγή της μόλυνσης, δηλαδή ανάπτυξη των καλλιεργειών όταν οι φορείς είναι απόντες ή οι αριθμοί είναι μικροί.
2. Η μη ανάπτυξη των καλλιεργειών κοντά σε υπάρχουσες καλλιέργειες του ίδιου είδους.
3. Η καταστροφή του υπέργειου μέρους των φυτών στις καλλιέργειες πατατόσπορου λίγο πριν την ωριμότητα, στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης, περιορίζει την εξάπλωση του ιού (μεταφορά στον κόνδυλο).
4. Ο ψεκασμός με ορυκτέλαια για τη μείωση της συχνότητας της μετάδοσης. Η εφαρμογή ορυκτέλαιων είναι μια σχετικά αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου των μη έμμονων ιών στον αγρό. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός της δράσης παραμένει ασαφής. Το έλαιο μπορεί να ενεργεί εμποδίζοντας την προσκόλληση του ιού ή την εκλεκτική προσρόφηση από τα μέρη του στόματος της αφίδας, ή να εμποδίζει τη δράση της βοηθητικής πρωτεΐνης. Ωστόσο, εάν το έλαιο ενεργεί στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιό και τον φορέα, είναι δύσκολο να εξηγηθεί η ανασταλτική επίδρασή του στην μετάδοση των μη έμμονων ιών. Η μείωση στη μετάδοση του ιού φαίνεται να είναι ανεξάρτητη απ' τη δομή των ιοσωματιδίων, της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας και της εξάρτησης από τη βοηθητική πρωτεΐνη. Υποστηρίζεται επίσης ότι το έλαιο επηρεάζει τη συμπεριφορά διείσδυσης του στιλέτου, πιθανόν μέσω της παρέμβασης στις αισθητήριες δομές του χείλους της αφίδας ή των στιλέτων. Η παρουσία ελαίου στην επιφάνεια του φύλλου, μπορεί να προκαλέσει λίπανση των ταρσών ή του χείλους της αφίδας, αποτρέποντας έτσι τα έντομα να βρουν ένα σταθερό κράτημα κατάλληλο για την εισαγωγή του στιλέτου. Σε οποιαδήποτε περίπτωση η επίδραση του ορυκτελαίου καταλήγει σε μειωμένη πιθανότητα μετάδοσης των μη έμμονων ιών στον αγρό (Powell 1991).
5. Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών.

6. Χρήση κίτρινων κολλωδών φύλλων και αντανakλαστικών καλυμμάτων. Τα αντανakλαστικά καλύμματα τοποθετούνται στην επιφάνεια του εδάφους που μένει ακάλυπτη από τα φυτά της καλλιέργειας (Buchen & Osmond 1987). Ενώ οι αφίδες που αναζητούν ξενιστή ελκύονται από τα πράσινα και τα κίτρινα, φαίνεται ότι απωθούνται από τα μπλε, τα βιολετί και τα υπεριώδη μήκη κύματος. Τα αντανakλαστικά καλύμματα προστασίας των φυτών που αντανakλούν τέτοια μήκη κύματος, απωθούν τις αφίδες από τα φυτά της καλλιέργειας και συνεπώς μειώνουν τη διάδοση του ιού. Το κάλυμμα από φύλλα αλουμινίου μείωσε το ρυθμό προσέλκυσης των αφίδων στα φυτά στο 96%. Το αλουμιnόχαρτο δεν είναι το μόνο υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης αχυρένιο κάλυμμα καθώς και λευκό πλαστικό κάλυμμα, με ποσοστό επιτυχίας 68%.
7. Χρήση ζώνης άλλου είδους φυτών στην καλλιέργεια για να μειωθεί η προσβολή των φυτών από τις αφίδες και κατά συνέπεια η μετάδοση του ιού. Ο Jenkinson (1955) ανέφερε μείωση στο ποσοστό μετάδοσης του ιού μωσαϊκό του κουνουπιδιού (Cauliflower mosaic virus, CaMV) σε φυτείες με μπρόκολα, στην περιφέρεια των οποίων υπήρχε ζώνη φασολιού, λάχανου ή κριθαριού. Η μείωση στο ποσοστό μετάδοσης ήταν αξιόλογη ακόμα και στην περίπτωση που οι φυτείες απείχαν μόλις λίγα μέτρα από την πηγή μόλυνσης. Το αποτέλεσμα της ύπαρξης ζώνης είναι η καθυστέρηση στην κίνηση των ιοφόρων άπτερων αφίδων, η οποία συμβάλλει στην εξάλειψη ή μείωση της μολυσματικότητας (DiFonzo 1995).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η γνώση της εποχικής αφθονίας και της σύνθεσης των ειδών αφίδων είναι απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη μιας στρατηγικής ελέγχου ενάντια στον ιό (Katis et al. 1998).

1.4 Μετάδοση ιών με έντομα

Οι ιοί των φυτών δεν εξέρχονται ποτέ από τα φυτά ξενιστές. Έτσι, οι φυτικοί ιοί δεν μπορεί να μεταφερθούν με τον άνεμο ή τη βροχή. Ακόμα και αν με κάποιο τρόπο βγει από τα φυτικά κύτταρα χυμός, τα σωματίδια των ιών που τυχόν περιέχονται στον χυμό αυτό, δεν μπορούν να μολύνουν άλλα φυτά, αν δεν υπάρξει δυνατότητα εισαγωγής τους μέσα σε ζωντανό κύτταρο. Οι ιοί των φυτών δεν έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια του συγκεκριμένου ξενιστή και με ενεργό τρόπο να στέλνουν το νουκλεϊκό οξύ στο πρωτόπλασμα. Τα κύτταρα των φυτών έχουν κυτταρικό τοίχωμα που δεν επιτρέπει παραλαβή ιών με πινοκύτωση (εγκόλπωση της κυτοπλασματικής μεμβράνης), όπως φαίνεται ότι συμβαίνει στα ζωικά κύτταρα (Γεωργόπουλος 1984).

Στη φύση για να επιτευχθεί η είσοδος των φυτικών ιών απαιτείται η λύση της συνέχειας των προστατευτικών στρωμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή η δημιουργία πληγών. Εξαίρεση θα μπορούσε να θεωρηθεί η μεταφορά ιών με τους κόκκους της γύρης. Πληγές μπορεί να προκληθούν είτε μηχανικά, με επαφή και τριβή γειτονικών φυτών, ή από οργανισμούς που μεταδίδουν ιούς. Ο οργανισμός ο οποίος μεταφέρει τον ιό από ασθενές σε υγιές φυτό, ονομάζεται **φορέας**. Υπάρχουν πολλοί φορείς των φυτικών ιών, όπως: έντομα, νηματώδης και μύκητες. Ακόμη, μετάδοση των ιών μπορεί να επιτευχθεί με το σπόρο, τη γύρη, με αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό, με εμβολιασμό και με το φανερόγαμο παράσιτο κουσκούτα (Γεωργόπουλος 1984).

Ωστόσο, ο πιο συνήθης και ο μεγαλύτερης οικονομικής σημασίας τρόπος μετάδοσης των ιών είναι με έντομα φορείς και αυτό για δύο λόγους. Πρώτον, γιατί μεταδίδουν μεγάλο αριθμό ιών και δεύτερον, γιατί οι εντομομεταδόμενοι ιοί είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας. Από τα 381 είδη ζωικών φορέων φυτικών ιών περίπου το 94% ανήκει στο φύλο Αρθρόποδα και το 6% στο φύλο Νηματοδών. Από τα Αρθρόποδα-φορείς το 99% είναι έντομα (Κατής 2000).

Περισσότερα από το 70% των εντόμων-φορέων ανήκουν στην τάξη των Ημίπτερων. Οι αφίδες (Οικογένεια: Aphididae) είναι οι σπουδαιότεροι φορείς αυτής της τάξης. Ακολουθούν κατά σειρά σπουδαιότητας οι οικογένειες

Jassidae (Cicadellidae), Membracidae και Delphacidae. Άλλα έντομα-φορείς είναι οι αλευρώδεις (Aleyrodidae), ορισμένα κοκκοειδή (Pseudococcidae), τα κολεόπτερα (Coleoptera) και οι θρύπες (Thysanoptera). Από τις υπόλοιπες ομάδες Αρθροπόδων μόνο τα Ακάρεα (Τάξη: Acarina- Οικογένεια: Eriophyiidae), που ανήκουν στην κλάση Arachnida, είναι σημαντικοί φορείς ιών (Κατής 2000).

Συνήθως οι φορείς ενός ιού ανήκουν σε μια ταξινομική οικογένεια ή γένος, αν και, όπως συμβαίνει σε κάθε κανόνα, υπάρχουν και εξαιρέσεις. Ο ιός π.χ. της δακτυλιωτής κηλίδωσης του καπνού μεταδίδεται με θρύπες, ακάρεα καθώς και με νηματώδεις (Κατής 2000).

Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στους σπουδαιότερους φορείς των ιώσεων, που όπως προαναφέρεται είναι οι αφίδες.

1.4.1 Μετάδοση με αφίδες

Δύο συστήματα ταξινόμησης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μετάδοση των ιών με έντομα. Το πρώτο βασίζεται στη χρονική διάρκεια που οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες, ενώ το δεύτερο βασίζεται στον τρόπο και τη θέση που βρίσκεται ο ιός στο έντομο κατά τη μετάδοση. Σύμφωνα με το πρώτο σύστημα που είναι και το παλαιότερο, οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως εξής:

- **Μη-έμμονοι**, όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες για λίγα λεπτά
- **Έμμονοι**, όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες για όλη τη διάρκεια της ζωής τους (διατηρούν της ικανότητα μετάδοσης του ιού και μετά την έκδυση).

Ο όρος ημί-έμμονος χρησιμοποιήθηκε αργότερα, για να καλύψει τις περιπτώσεις εκείνες, όπου τα έντομα παραμένουν ιοφόρα από μία έως μερικές μέρες. Αυτή η μέθοδος ταξινόμησης έχει το πλεονέκτημα ότι στηρίζεται σε μια ιδιότητα, όπως η διάρκεια που οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες, που εκτιμάται αρκετά εύκολα, ενώ από την άλλη πλευρά είναι γνωστό ότι η ιδιότητα αυτή επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλο-

ντος και η δραστηριότητα των αφίδων πριν και μετά την πρόσληψη του ιού (Κατής 2000).

Το δεύτερο σύστημα προτάθηκε από τους Kennedy et al. (1962) και έδωσε έμφαση στη θέση συγκράτησης του ιού στο φορέα. Σύμφωνα με αυτό, οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως φερόμενοι επί των σιλήτων ή ως κυκλοφορούντες. Στους φερόμενους επί των σιλήτων ιούς ανήκουν οι μη-έμμονοι, μικρός αριθμός των ημι-έμμονων ιών και μερικοί έμμονοι σύμφωνα με το προηγούμενο σύστημα ταξινόμησης. Οι κυκλοφορούντες ιοί περιλαμβάνουν την πλειονότητα των έμμονων ιών. Ο όρος κυκλοφορούντες αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ο ιός προσλαμβάνεται με το μολυσμένο χυμό, απορροφάτε διαμέσου του εντερικού τοιχώματος και μεταφέρεται στα υγιή φυτά. Οι κυκλοφορούντες ιοί, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται στο σώμα των αφίδων-φορέων ονομάζονται κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενοι ιοί. Το τρίτο σύστημα που προτάθηκε πρόσφατα, διαιρεί τους ιούς που μεταδίδονται με έντομα σε δύο κατηγορίες: στους μη κυκλοφορούντες, που περιλαμβάνει τους μη-έμμονους και ημι-έμμονους, και στους κυκλοφορούντες, όπου περιλαμβάνονται μόνο οι έμμονοι. Οι κυκλοφορούντες υποδιαιρούνται στους κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενους στο φορέα, και στους κυκλοφορούντες-μη πολλαπλασιαζόμενους που δεν πολλαπλασιάζονται στο φορέα. ωστόσο, έχει επικρατήσει η χρήση των όρων μη-έμμονος, ημι-έμμονος και έμμονος ιός (Κατής 2000).

1.4.1.1 Μη-έμμονοι ιοί

Στην κατηγορία των μη-έμμονων ιών ανήκουν περισσότεροι από 100 ιοί, από τους οποίους ορισμένοι είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας. Με αυτόν τον τρόπο μεταδίδονται ιοί των γενών Potyvirus, Carlavirus, Caulimovirus (με το είδος *Myzus persicae*), Cucumovirus, Alfamovirus και Fabavirus. Τα γένη αυτά περιλαμβάνουν σφαιρικούς και νηματοειδείς ιούς, ιούς με DNA ή RNA γονιδίωμα, καθώς και ιούς με μονομερές, διμερές και τριμερές γονιδίωμα.

Η μετάδοση μ' αυτόν τον τρόπο έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Η πρόσληψη του ιού επιτυγχάνεται μετά από νύγματα δοκιμών των αφίδων στα ασθενή φυτά διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών (Κατής 2000). Οι αφίδες κάνουν πρόσληψη όχι μόνο μορίων του ιού, αλλά σε πολλές περιπτώσεις και μιας ιογενούς κωδικοποιημένης «βοηθητικής πρωτεΐνης», η οποία προσκολλάται στα σιλέτα. Προτάθηκε ότι η βοηθητική πρωτεΐνη, που είναι παρούσα σε αρκετές ομάδες των μη έμμονων ιών, ενεργεί ως μια γέφυρα ανάμεσα στα ιοσωμάτια και στις περιοχές συγκράτησης των σιλέτων. Τα νύγματα δοκιμών που είναι υπεύθυνα για την μετάδοση του μη έμμονου ιού, μπορεί να καταγραφούν και να γίνουν ορατά, χρησιμοποιώντας τη συσκευή EPG. Με αυτή την τεχνική, διακρίνονται τρεις δευτερεύουσες φάσεις II-1, II-2 και II-3. Η πρόσληψη του ιού γίνεται στην δευτερεύουσα φάση II-3 (Fereres 2001).
- Τα ιοφόρα άτομα έχουν τη δυνατότητα άμεσης μετάδοσης του ιού (δεν απαιτείται λανθάνουσα περίοδος) σε υγιή φυτά μετά από νύγματα δοκιμών, διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών.
- Οι αφίδες διατηρούν τη μολυσματικότητά τους για λίγα λεπτά έως μερικές ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό. Γι' αυτό οι μεταδιδόμενοι μ' αυτόν τον τρόπο ιοί ονομάζονται μη-έμμονοι.
- Οι μη-έμμονοι ιοί μεταφέρονται στα στοματικά μόρια των εντόμων και δεν πολλαπλασιάζονται στους ιστούς του φορέα. Συγκεκριμένα ο ιός συγκρατείται στα σιλέτα της αφίδας και δεν εισέρχεται στο μεσοέντερο του φορέα, γι' αυτό οι αφίδες χάνουν την ιοφόρα ικανότητα μετά την έκδυση (Κατής 2000).

Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης των μη-έμμονων ιών αυξάνεται όταν τα έντομα υποβάλλονται σε νηστεία (για λίγα λεπτά ή μερικές ώρες), πριν τους επιτραπούν νύγματα δοκιμών σε μολυσμένα φυτά. Αρκετοί συγγραφείς πρότειναν διάφορες εξηγήσεις για το φαινόμενο. Οι Wang et al. (1996) πρότειναν την ύπαρξη μιας ουσίας που απενεργοποιεί τον ιό και ίσως μεταφέρεται με το σίελο της αφίδας ή είναι παρούσα στο χυμό του φυτού και παραμένει στα σιλέτα της αφίδας μετά τη βρώση και συνεπώς θα απουσίαζε στις αφίδες που ήταν σε νηστεία πριν την πρόσληψη του ιού. Ο Harris (2001) πρότεινε ότι οι διαφορές συμπεριφοράς μπορεί να είναι υπεύθυνες για το παρατηρούμενο

φαινόμενο. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι η διατροφή θα μπορούσε να αποτρέψει τις αφίδες απ' την τυπική τους συμπεριφορά της δοκιμής του φυτού, που περιλαμβάνει σύντομα νύγματα με στόχο την επιλογή φυτού ξενιστή. Οι αφίδες που δεν νηστεύουν θα έδειχναν αντίθετα μια συμπεριφορά αναζήτησης φλοιώματος, πολύ λιγότερο πιθανή να καταλήξει στην πρόσληψη του ιού.

Η περιγραφόμενη επίδραση της νηστείας δεν φαίνεται να ισχύει για κάθε είδος αφίδας. Έχει αναφερθεί ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα είδος αφίδας, η αφίδα του λάχανου, η *Brevicoryne brassicae*, (Hemiptera, Aphididae), η οποία δεν παρουσιάζει αυτού του είδους τη συμπεριφορά. Η *B. brassicae* τείνει να τρέφεται συνεχώς για τουλάχιστον 5 λεπτά αμέσως μετά τη νηστεία, ενώ η *M. persicae* κάνει αρκετά σύντομα νύγματα που διαρκούν περίπου 30 δευτερόλεπτα. Ωστόσο, άλλες εξηγήσεις που δεν έχουν σχέση με τη συμπεριφορά για την επίδραση της νηστείας πριν την πρόσληψη δεν θα πρέπει να αποκλείονται (όπως προτάθηκε απ' τους Wang & Pirone το 1996) (Fereres & Collar 2001).

Τα νύγματα δοκιμών των εντόμων μετά από νηστεία, είναι συνήθως μικρής διάρκειας (δευτερολέπτων ή λίγων λεπτών), πράγμα που ευνοεί την πρόσληψη των μη-έμμονων ιών. Επειδή η πρόσληψη, αλλά και η μετάδοση, των μη-έμμονων ιών από τις αφίδες-φορείς επιτυγχάνεται με σύντομα νύγματα δοκιμών πιστεύεται ότι τόσο η πρόσληψη, όσο και η μετάδοση, των ιών αυτών γίνεται στα επιδερμικά κύτταρα του ξενιστή. Η παρουσία των ιών αυτών στα επιδερμικά κύτταρα των ξενιστών τους δικαιολογεί τη σχετικά εύκολη μετάδοσή τους μηχανικά (με χυμό) στο εργαστήριο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι καθοριστικοί παράγοντες μεταδοτικότητας των ιών είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη των ιοσωματίων και η βοηθητική πρωτεΐνη (Κατής 2000).

1.4.1.1.1 Θεωρίες μη-έμμονης μετάδοσης ιών

Ο μηχανισμός της απελευθέρωσης του ιού απ' την αφίδα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Έχουν προταθεί δύο διαφορετικές υποθέσεις για να εξηγήσουν τη διαδικασία της μετάδοσης του μη έμμονου ιού με αφίδες.

→ Θεωρία αναρρόφησης- εκρόφησης (Harris 1977).

Ο Harris πρότεινε ότι οι αφίδες θα μπορούσαν να αποβάλλουν από τον πεπτικό σωλήνα χυμό που προηγούμενα είχε εισέλθει μέσα σε αυτό και έτσι να εκβάλουν συγχρόνως και τα ιοσωμάτια. Πρότεινε δηλαδή ότι, η αντλία του cibarium της αφίδας μπορεί και λειτουργεί και προς τις δύο κατευθύνσεις, είτε για την κατάποση είτε για την αποβολή. Έτσι οι αφίδες μπορούν κατά τη διαδικασία πρόσληψης της τροφής, να αντιστρέψουν τη ροή της αντλίας και να μεταδώσουν τον ιό στα φυτά.

→ Θεωρία έκκρισης σιέλου.

Οι Martin et al. (1997), χρησιμοποιώντας τη συσκευή EPG, ανέφεραν ότι η απελευθέρωση των μη έμμονων ιών, λαμβάνει χώρα στην δευτερεύουσα φάση II-1, της ενδοκυτταρικής διατήρησης με το σιλέτο. Κατά τη διάρκεια αυτής, παρατηρείται άφθονη έκκριση σιέλου, μέσω της οποίας μεταφέρονται μόρια του ιού στο κυττόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Τα ιοσωμάτια μπορούν και απελευθερωθούν με την έκκριση σιέλου, επειδή οι τροφικοί και σιελοφόροι αγωγοί μέσα στα γναθικά σιλέτα, συγκλίνουν και εκτείνονται περίπου 2-8μm από την κορυφή. Η αλληλουχία των γεγονότων έτσι όπως καταγράφεται σε συσκευή EPG, καταδεικνύει την έκκριση σιέλου ως πιθανότερο μηχανισμό εξήγησης της διαδικασίας μετάδοσης των μη έμμονων ιών, σε σχέση με την αποβολή της τροφής από τον πεπτικό σωλήνα (Harris & Harris 2001, Fereres & Collar 2001).

1.4.1.2 Ημί-έμμονοι ιοί

Περίπου 15 ιοί μεταδίδονται με ημί-έμμονο τρόπο. Απ' αυτούς οι καλύτερα μελετημένοι είναι ο ίκτερος των τεύτλων (BYV) και η τριστέσα των εσπεριδοειδών (CTV). Τα ιοσώματα του ιού του ίκτερου των τεύτλων εντοπίζονται στο φλοίωμα των ασθενών φυτών και προκαλούν ίκτερο των φύλλων των τεύτλων. Βασικά οι ιοί αυτοί είναι μη-έμμονοι, με την έννοια ότι δεν κυκλοφορούν στο σώμα των εντόμων, αλλά τα έντομα-φορείς διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης μέχρι 3 έως 4 ημέρες. Ο ελάχιστος χρόνος πρόσληψης των ημί-έμμονων ιών είναι 30 λεπτά, αν και η αποτελεσματικότητα μετάδοσης είναι

μεγαλύτερη, όταν ο χρόνος πρόσληψης αυξάνεται σε μερικές ώρες. Όπως και οι έμμονοι ιοί, οι ημί-έμμονοι εντοπίζονται συνήθως στο φλοίωμα των ασθενών φυτών και συνεπώς οι αφίδες πρέπει να έλθουν σε επαφή με αυτούς τους ιστούς προκειμένου να προσλάβουν και να μεταδώσουν τους ιούς αυτούς. Η νηστεία των αφίδων πριν από τα νύγματα διατροφής στα μολυσμένα φυτά δεν αυξάνει την αποτελεσματικότητα μετάδοσης των ημί-έμμονων ιών. Επίσης οι ημί-έμμονοι ιοί δεν μεταδίδονται μετά την έκδυση των αφίδων (Κατής 2000).

1.4.1.3 Έμμονοι ιοί

Οι ιοί που μεταδίδονται με έμμονο τρόπο έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- ↪ Για την πρόσληψη του ιού απαιτείται μεγάλης διάρκειας διατροφικής δραστηριότητας στο μολυσμένο ξενιστή. Αν και μερικά είδη αφίδων μεταδίδουν έμμονους ιούς όταν τρέφονται στο μολυσμένο ξενιστή για 20 μόνο λεπτά, η αποτελεσματικότητα μετάδοσης αυξάνεται όταν ο χρόνος διατροφής κυμαίνεται από 6-24 ώρες.
- ↪ Απαιτείται μια λανθάνουσα περίοδος, μεγαλύτερη των 12 ωρών από την πρόσληψη του ιού από το φορέα μέχρι τη στιγμή που γίνεται ικανός να μολύνει άλλα φυτά.
- ↪ Τα έντομα διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης των ιών τουλάχιστον για μία εβδομάδα ή, στις περισσότερες περιπτώσεις, για όλη τη διάρκεια της ζωής τους.
- ↪ Τα ιοφόρα άτομα διατηρούν τη μολυσματικότητα και μετά την έκδυση, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται «μετάδοση του ιού από στάδιο σε στάδιο» (Κατής 2000).

Οι έμμονοι ιοί διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: σ' αυτούς που δεν πολλαπλασιάζονται στον φορέα, όπως ο ιός του κίτρινου νανισμού του κριθαριού (BYDV), και σ' αυτούς που πολλαπλασιάζονται στον φορέα, όπως ο ιός του νεκρωτικού ίκτερου του μαρουλιού (LNIV). Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου οι έμμονοι ιοί κυκλοφορούν στο σώμα των εντόμων. Η κυκλο-

φορία του ιού γίνεται από τα στοματικά μόρια στον πεπτικό σωλήνα, στην αιμολέμφο και καταλήγει στους σιελογόνους αδένες απ' όπου με το σάλιο εισάγεται κατά τη διατροφή στο υγιές φυτό (Κατής 2000).

Οι έμμονοι ιοί που πολλαπλασιάζονται στον φορέα ονομάζονται «πολλαπλασιαζόμενοι ιοί» και μερικές φορές μεταδίδονται και στους απογόνους. Αυτός ο τρόπος μετάδοσης του ιού ονομάζεται «μετάδοση με τα αυγά» και αποδείχθηκε ότι συμβαίνει με τον ιό των κίτρινων νεύρων ενός είδους ζωχού (*Sonchus arvensis*) στο φορέα *Hyperomyzus lactucae* (Linnaeus) (Hemipter, Aphididae) (Κατής 2000).

Σε αντίθεση με τους μη-έμμονους ιούς, οι οποίοι μεταδίδονται με μεγάλο αριθμό ειδών αφίδων, τα περισσότερα των οποίων δεν έχουν ως κύριο ξενιστή τον ξενιστή του ιού, οι έμμονοι ιοί εμφανίζουν υψηλό αριθμό εξειδίκευσης στη σχέση τους με τον φορέα. Καταρχήν η μετάδοση των έμμονων ιών γίνεται μόνο από είδη αφίδων που αποικίζουν στον ξενιστή του ιού. Έτσι ο ιός του καρουλιάσματος της πατάτας (PLRV) μεταδίδεται από τα είδη *M. persicae*, *Aphis nasturtii* (Kaltenbach), *Myzus ascalonicus* (Doncaster), *Aphis fabae* (Scopoli) και *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera, Aphididae), που έχουν ως ξενιστή την πατάτα. Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης δεν αυξάνεται όταν τα έντομα υποβληθούν σε νηστεία, πριν τραφούν στα ασθενή φυτά. Οι έμμονοι ιοί εντοπίζονται κυρίως στο φλοίωμα των φυτών και πιθανόν αυτός είναι ο λόγος που οι περισσότεροι δεν μεταδίδονται μηχανικά με χυμό (Κατής 2000).

ΙΟΣ	ΦΟΡΕΑΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
Ευλογιά της δαμασκηνιάς (<i>Plum pox virus</i>)	<i>Myzus persicae</i>	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό της μηδικής (<i>Alfalfa mosaic virus, AMV</i>)	<i>M. persicae</i>	Μη-έμμονος
Κοινό μωσαϊκό της φασο- λιάς (<i>Bean common mosaic virus, BCMV</i>)	<i>Acyrtosiphum pisum*</i>	Μη-έμμονος
Κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς (<i>Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV</i>)	<i>M. persicae</i>	Μη-έμμονος
Κίτρινο μωσαϊκό της φασο- λιάς (<i>Bean yellow mosaic virus, BYMV</i>)	<i>A. pisum*</i>	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό των τεύτλων (<i>Beet mosaic virus, BtMV</i>)	<i>M. persicae*</i>	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό της αγγουριάς (<i>Cucumber mosaic virus, CMV</i>)	Διάφορα είδη	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό με νανισμό του καλαμποκιού (<i>Maize dwarf mosaic virus, MDMV</i>)	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Μη-έμμονος
Μωσαϊκό του μαρουλιού (<i>Lettuce mosaic virus, LMV</i>)	<i>M. persicae*</i>	Μη-έμμονος
Αφιδομεταδιδόμενος ίκτε- ρος των κολοκυνθοειδών (<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV</i>)	<i>Aphis gossypii</i> , <i>M. persicae</i>	Έμμονος
Καρούλιασμα των φύλλων της πατάτας (<i>Potato leafroll virus, PLRV</i>)	<i>M. persicae</i>	Έμμονος
Κίτρινος νανισμός του κρι- θαριού (<i>Barley yellow dwarf vi- rus, BYDV</i>)	<i>Acyrtosiphum dirhodum*</i> , <i>M. persicae</i>	Έμμονος
Νεκρωτικός ίκτερος του μα- ρουλιού (<i>Lettuce necrotic yellows virus, LNYV</i>)	<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Έμμονος
Ίκτερος των τεύτλων (<i>Beet yellows virus, BYV</i>)	<i>M. persicae*</i>	Ημί-έμμονος
Τριστέτσα (<i>Citrus tristeza virus, CTV</i>)	<i>Toxoptera citricida</i>	Ημί-έμμονος

Πίνακας 3. Παραδείγματα ιών που μεταδίδονται με αφίδες (Κατής, 2000)

1.5 Μηχανική μετάδοση ιών

Η μετάδοση ενός ιού από ένα μολυσμένο σε ένα υγιές φυτό είναι μια διαδικασία θεμελιώδης για τη μελέτη των ιών και για το διαχωρισμό τους από άλλα μη-μεταδοτικά αίτια ασθενειών, όπως ελλείψεις θρεπτικών στοιχείων ή δυσμενείς επιδράσεις παραγόντων του περιβάλλοντος.

Η μηχανική μετάδοση, είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια. Πρώτον, την επιτυχή εξαγωγή του ιού από τον μολυσμένο φυτικό ιστό μέσω λειοτρίβησης και δεύτερον, τη μεταφορά και επάλειψη του μολυσματικού χυμού στην επιφάνεια των υγιών φυτών, έτσι ώστε ο ιός να εισχωρήσει στα κύτταρα (Κατής 2000).

Χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την απομόνωση ιών από μολυσμένα φυτά αγρού και διατήρησή τους στο εργαστήριο. Επίσης, χρησιμοποιείται για τη μετάδοση ιών σε φυτά δείκτες όπου η παρατήρηση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων που προκαλούνται μπορεί να οδηγήσει στην διάγνωση και την ταυτοποίησή τους. Η ίδια μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό ιών από μικτές μολύνσεις όταν αυτοί προκαλούν διαφορετικά συμπτώματα στον ίδιο ξενιστή ή μολύνουν διαφορετικούς ξενιστές. Τέλος, οι μηχανικές μολύνσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές μολυσματικότητας, όπου η μολυσματική ικανότητα του ιού μετράτε με τον αριθμό των τοπικών κηλίδων που προκαλούνται από το μόλυσμα στα φύλλα ειδικά επιλεγμένων ξενιστών. Με τη μέτρηση της μολυσματικότητας μπορεί ακόμη να μελετηθεί η επίδραση πολλών παραγόντων στον ιό (Κατής 2000).

Η μέθοδος της μηχανικής μετάδοσης παρουσιάζει δύο σημαντικά μειονεκτήματα, **(α)** ο χρόνος που απαιτείται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 2-3 ημέρες έως και λίγες εβδομάδες και **(β)** η ανάγκη ύπαρξης θερμοκηπιακών εγκαταστάσεων για τη συνεχή παραγωγή φυτοδεικτών και τη διατήρησή τους μετά τη μόλυνση για την ανάπτυξη συμπτωμάτων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μεθόδου μπορεί να επηρεαστούν από πολλούς εξωτερικούς παράγοντες, όπως η πηγή και η προετοιμασία του μολύσματος, η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και παράγοντες του περιβάλλοντος. Παρ' όλα αυτά, η μηχανική μετάδοση αποτελεί ακόμη και σήμερα βασικό «εργαλείο» στα χέρια της σύγχρονης ιολογίας, ιδιαίτερα στην περί-

πτωση νέων ιών για τους οποίους δεν υπάρχουν άλλα διαγνωστικά εργαλεία (Κατής, 2000).

1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηχανική μετάδοση με χυμό

Η μηχανική μετάδοση με χυμό απαιτεί την επιτυχή εκχύλιση του ιού από τους ιστούς του μολυσμένου ξενιστή και τη μεταφορά του μολυσμένου χυμού στην επιφάνεια του υγιούς ευπαθούς φυτοδέκτη σε τέτοια κατάσταση ώστε ο ιός να μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα του φυτοδέκτη θα πρέπει να φέρουν πληγές, για να διευκολυνθεί η είσοδος του ιού και φυσικά να στηρίζουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη συμπτωμάτων της ασθένειας. Για να είναι επιτυχής η μηχανική μετάδοση, ιδιαίτερη σημασία έχει η επιλογή του φυτικού ιστού που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του μολύσματος. Η κατανομή του ιού και η συγκέντρωσή του μπορεί να ποικίλει μέσα στο φυτό-ξενιστή και ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ξυλώδης ξενιστές. Στην περίπτωση αυτή συνίσταται η χρήση ριζιδίων σαν πηγή μολύσματος για τη μηχανική μόλυνση. Επιπλέον, ο χυμός ορισμένων φυτών περιέχει συστατικά τα οποία παρεμποδίζουν τη μετάδοση του ιού, και η μεταδοτική ικανότητά του και η κατανομή τους μπορεί να ποικίλει στα διάφορα φυτικά τμήματα. Έτσι πολυφαινόλες που εντοπίζονται κυρίως σε ξυλώδεις ξενιστές, αναστέλλουν τη μόλυνση. Η συγκέντρωση των ουσιών αυτών παρουσιάζεται μειωμένη στις κορυφές των φύλλων, στα τμήματα του άνθους και ορισμένες φορές στις άκρες των ριζών σε φυτά που βρίσκονται στην περίοδο της ανάπτυξης. Για τη σωστή μόλυνση επιλέγονται νεαρά πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα με έντονα συμπτώματα τα οποία περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ιού και μικρότερη ποσότητα αναστολέων (Κατής, 2004).

Με την επιλογή του κατάλληλου φυτικού ιστού το μόλυσμα παρασκευάζεται με ομογενοποίηση του φυτικού τμήματος σε ένα γουδί με γουδοχέρι, (ψυγμένα εκ των προτέρων σε ψυγείο), με τη βοήθεια του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα αυτό αποβλέπει στην ασφαλή απελευθέρωση του ιού από τα φυτικά κύτταρα, καθώς και την προστασία του από φυτικούς μεταβολίτες και κυτταρικά κατάλοιπα που απελευθερώνονται κατά την ομογενοποίηση μαζί με τον ιό και μπορεί να προκαλέσουν την αδρανοποίησή του.

Το ιονικό περιβάλλον του διαλύματος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του μολύσματος είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη σταθερότητα, τη μολυσματικότητα και τη διαλυτότητα των φυτικών ιών. Η μολυσματικότητα των περισσότερων ιών μειώνεται σε όξινο περιβάλλον. Το διάλυμα μόλυνσης διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία για να αποφευχθεί η απώλεια της μολυσματικότητας του ιού (Κατής 2004).

Κατά το στάδιο της μόλυνσης σημαντική είναι η δημιουργία επιφανειακών τραυμάτων που θα επιτρέψουν την είσοδο του ιού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πληγωτικές ουσίες, όπως το Carborudum (silicon carbide), μεγέθους 300-600 mesh, με τα οποία επικονιάζουμε την επιφάνεια του φυτού που πρόκειται να μολυνθεί. Ακολουθεί η εφαρμογή του μολύσματος στο φυτό δέκτη, που μπορεί να γίνει με τη βοήθεια των δακτύλων μας, είτε με τη βοήθεια μιας γάζας ή ενός βαμβακοφόρου, είτε τέλος με ψεκασμό (Κατής, 2004).

Για να είναι επιτυχής η μόλυνση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η είσοδος του ιού από πληγές ή σπασμένες επιδερμικές τρίχες, ο πολλαπλασιασμός του στα επιδερμικά κύτταρα και η εισαγωγή του στο αγγειακό σύστημα για την αποίκιση κι άλλων ιστών.

Για την εμφάνιση συμπτωμάτων του ιού στο φυτό δέκτη θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη:

1. γενετικοί παράγοντες του φυτού
2. συνθήκες του περιβάλλοντος (φως, T °C)
3. η φυσιολογική κατάσταση του φυτού κατά τη μόλυνση

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η ευπάθεια των φυτών αυξάνεται όταν πριν από τη μόλυνση αυτά τοποθετηθούν στο σκοτάδι για περίπου 1-2 μέρες (Κατής, 2004).

1.6 Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA

(Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Η χρήση ενζύμων για τη σήμανση αντισωμάτων αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1966 και αναπτύχθηκε για τον εντοπισμό αντιγόνων σε ιστολογικά παρασκευάσματα, τόσο σε οπτικό όσο και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, καθώς και για την αναγνώριση γραμμών καθίζησης σε δοκιμές ανοσοδιάχυσης. Ως ορολογική διαγνωστική μέθοδος, το 1977 εισήχθη για πρώτη φορά η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA, η οποία στη συνέχεια εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού ιών (αντιγόνων). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ταυτοποίηση σοβαρών παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων, τη διάγνωση ιών και αργότερα για τη διάγνωση και άλλων φυτοπαθογόνων, όπως βακτήρια, μύκητες και φυτοπλάσματα (Κατής 2004).

Στην ELISA χρησιμοποιείται αντιορός με αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο ιό (αντιγόνο). Με την ανίχνευση του συμπλόκου αντισώματος και του ομόλογου αντιγόνου συμπεραίνεται η ύπαρξη του ιού στο δείγμα. Για την εξαγωγή αξιόπιστων και επαναλήψιμων συμπερασμάτων σε κάθε ορολογική δοκιμή περιλαμβάνονται δύο δείγματα (μάρτυρες) γνωστής αντίδρασης (ένα θετικό και ένα αρνητικό) (Κατής 2004).

Ακόμη και σήμερα, παρ' όλη την ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών μεθόδων μεγάλης ακρίβειας και ευαισθησίας, η ορολογική δοκιμή (ELISA) παραμένει η πλέον διαδεδομένη μέθοδος τόσο για διαγνώσεις ρουτίνας όσο και για ερευνητικούς σκοπούς, γιατί παρουσιάζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

1. υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητες ανίχνευσης πολύ μικρών ποσοτήτων (συνήθως 1-10ng/ml) αντιγόνου (ιού),
2. ταχεία λήψη αποτελεσμάτων. Συνήθως είναι διαθέσιμα μέσα σε 6-24 ώρες,
3. δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων,
4. μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε εκχύλισμα φυτών, όσο και σε καθαρά παρασκευάσματα ιών,
5. εξειδίκευση, για τη διαφοροποίηση οροτύπων ενός ιού,

6. μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση «τεμαχισμένων» αλλά και άθικτων ιοσωμάτων,
7. δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού του αντιγόνου (ιού) στο υπό εξέταση δείγμα,
8. δυνατότητα αυτοματοποίησης και παραγωγής kit (αυτόματο πλύσιμο των μικροπλάκων, ταυτόχρονη διανομή των αντιδραστηρίων σε όλα τα φρεάτια, κ.λ.π.),
9. χαμηλό κόστος και διατήρηση των αντιδραστηρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα,
10. δεν απαιτείται ιδιαίτερα ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός
11. χρήση μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων και αντιορού.

Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν συμβάλει στην ευρύτατη αποδοχή και χρήση της μεθόδου από όλα τα ιολογικά εργαστήρια.

Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι της ανασοενζυμικής δοκιμής ELISA, οι κυριότεροι των οποίων είναι η άμεση και η έμμεση (Κατής 2004).

1.6.1 Κατηγορίες άμεσης ELISA

1.6.1.1. Άμεση DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Method-ELISA)

Είναι ο τύπος της δοκιμής που περιέγραψαν οι Clark&Adams (1977) και σήμερα είναι ο πιο διαδεδομένος. Η ELISA γίνεται σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων. Τα διάφορα στάδια της άμεσης (Double Antibody Sandwich, DAS) ELISA είναι τα εξής:

- Τα φρεάτια της μικροπλάκας καλύπτονται αρχικά με γανοσφαιρίνη (IgG) που έχει απομονωθεί (καθαρισθεί) για το σκοπό αυτό από τον αντιορό.
- Ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C και μετά ξέπλυμα με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Προσθήκη οροαλβουμίνης (Αλβουμίνης ορού από βοοειδή, Bovine serum albumin, BSA) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο για την αποφυγή μη εξειδικευμένων αντιδράσεων, με αποτέλεσμα στο

επόμενο στάδιο της δοκιμής να δεσμεύεται το αντιγόνο (δείγμα) σύμφωνα μόνο με την ειδική αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος.

- Προσθήκη του ομογενοποιημένου με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος και επώαση της μικροπλάκας όλη νύχτα στους 4°C.
- Την επόμενη μέρα, ξέπλυμα της μικροπλάκας, τοποθέτηση της συζευγμένης γ-ανοσοσφαιρίνης και επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C.
- Μετά το τέλος της επώασης ξέπλυμα και προσθήκη του ανάλογου υποστρώματος, το οποίο εξαρτάται από το ένζυμο με το οποίο έχει γίνει η σήμανση της γ-σφαιρίνης.

Στα φρεάτια που είχαν τοποθετηθεί θετικά δείγματα εμφανίζεται χρώμα λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος από το συζευγμένο ένζυμο. Για τη σύζευξη της γ-σφαιρίνης χρησιμοποιείται συνήθως το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και η αναγνώρισή του γίνεται από το υπόστρωμα *p*-nitrophenylphosphate. Για να εμφανιστεί το κίτρινο χρώμα, πρέπει να υπάρξει διαδοχική σε κάθε στάδιο αναγνώριση/σύνδεση των αντισωμάτων με τα ομόλογα αντιγόνα. Σε αυτή μόνο την περίπτωση θα υπάρξει κατά το τελευταίο στάδιο η αλκαλική φωσφατάση που καταλύει το «σπάσιμο» των φωσφοδιεστερικών δεσμών του υποστρώματος (κίτρινο χρώμα). Η εκτίμηση της έντασης του χρώματος μπορεί να καταγραφεί με ειδικό φωτόμετρο (ποσοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων) ή να εκτιμηθεί από τον ερευνητή (ποιοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων). Η υδρόλυση του υποστρώματος συνήθως αναστέλλεται με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου ή θειικού οξέος στα φρεάτια της μικροπλάκας πριν από τη μέτρηση της έντασης του χρώματος (Κατής 2004).

Η άμεση ELISA έχει δύο μειονεκτήματα:

1. Μπορεί να είναι τόσο εξειδικευμένη, ώστε αντισώματα εναντίον μιας φυλής να μην αναγνωρίζουν άλλη φυλή του ίδιου ιού. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι αρκετά χρήσιμο για τη διαφοροποίηση φυλών, αλλά αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα, όταν στόχος της εργασίας είναι η ανίχνευση όλων των οροτύπων ενός ιού. Η υψηλή εξειδίκευση είναι σχεδόν σίγουρο ότι οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη του ενζύμου με το αντίσωμα αλληλεπιδρά με ασθενείς αντιδράσεις με φυλές που δεν είναι στενά συγγενικές.

2. Απαιτεί για την εκτέλεσή της την προετοιμασία για κάθε ιό νέου συζεύγματος ενζύμου-αντισώματος (Κατής 2004).

1.6.1.2. Άμεση ACP-ELISA (Antigen Coated Plated ELISA)

Είναι ο ίδιος τύπος που περιγράφηκε παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι στο πρώτο στάδιο αντί της γ-σφαιρίνης προσκολλάται στα φρεάτια το αντιγόνο. Η ACP-ELISA (Antigen Coated Plated ELISA) γίνεται επίσης σε μικροπλάκες πολυστυρενίου. Τα διάφορα στάδια είναι τα εξής:

- τα φρεάτια της μικροπλάκας καλύπτονται αρχικά με αντιγόνο (πρωτεΐνη του ιού μέσα στο ομογενοποιημένο δείγμα)
- ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C και μετά ξέπλυμα με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα
- προστίθεται επίσης οροαλβουμίνη (Bovine serum albumin, BSA) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο για την αποφυγή των ειδικών αντιδράσεων
- ακολουθεί η προσθήκη γ-σφαιρίνης συζευγμένης με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και επώαση της μικροπλάκας όλη νύχτα στους 4°C
- την επόμενη μέρα, ξεπλένεται η μικροπλάκα και προστίθεται το υπόστρωμα p-nitrophenylphosphate.

Στα φρεάτια όπου είχαν τοποθετηθεί θετικά δείγματα εμφανίζεται χρώμα λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος από το συζευγμένο ένζυμο (Κατής 2004).

1.6.2 Έμμεση ELISA (Indirect ELISA)

Στην έμμεση ELISA (Indirect ELISA), το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την τελική ανίχνευση του αντιγόνου, είναι συζευγμένο σε ένα αντίσωμα. Έτσι αν π.χ. η παραγωγή των αντισωμάτων εναντίον του ιού έγινε σε ποντίκι, μια «αντι-ποντίκι» ανοσοσφαιρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η «αντι-ποντίκι» σφαιρίνη μπορεί να παραχθεί σε κατσίκια που αναγνωρίζει ως ξένη ουσία την πρωτεΐνη του ποντικίου που εισήχθη μέσω ένεσης στην κατσίκια.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ένα και μοναδικό σύζευγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλους τους ιούς και όλοι οι ορότυποι ενός ιού μπορούν να ανιχνευτούν με αντισώματα εναντίον μιας μόνο φυλής.

Τα στάδια της έμμεσης ELISA είναι τα παρακάτω:

- τα φρεάτια καλύπτονται αρχικά από γ-ανοσοσφαιρίνες κουνελιού (IgG) (σε συγκέντρωση 1-10ng/ml) έναντι του υπό εξέταση ιού (εξειδικευμένο αντίσωμα)
- ακολουθεί επώαση στους 37°C
- πλύσιμο της μικροπλάκας και επώαση στους 4°C με το αντιγόνο (ιό)
- προσθήκη ανοσοσφαιρινών που παρασκευάστηκαν σε ποντίκι και επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C
- επανάληψη πλυσίματος της μικροπλάκας και στη συνέχεια προσθήκη συζεύγματος «αντι-ποντίκι» σφαιρίνης, η οποία παρασκευάστηκε σε κατσίκα και ανοσοποιήθηκε με γ-σφαιρίνη από ποντίκι. Επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C
- τέλος, ακολουθεί η προσθήκη του ειδικού υποστρώματος που υδρολύει το ένζυμο και δίνει χρώμα.

Οι κατηγορίες της έμμεσης ELISA είναι δύο. Η ACP-ELISA και η TAS-ELISA. Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία της ACP-ELISA είναι τα εξής δύο: επίστρωση με φυτικό εκχύλισμα (ιός), προσθήκη πολυκλωνικού αντισώματος, προσθήκη συζεύγματος αντισφαιρίνης κουνελιού και προσθήκη υποστρώματος. Για την εκτέλεση της TAS-ELISA τα στάδια που λαμβάνουν χώρα είναι: επίστρωση με ειδικό αντίσωμα, προσθήκη δείγματος (ιού), προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος, προσθήκη συζεύγματος αντισφαιρίνης ποντικίου και προσθήκη υποστρώματος (Κατής 2004).

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Ο ιός Υ της πατάτας (*Potato virus Y, PVY*) ανήκει στο γένος *Potyvirus* της οικογένειας *Potyviridae*. Αποτελεί σοβαρό ιό πολλών καλλιεργειών. κυρίως μολύνει φυτά της οικογένειας *Solanaceae*, όπως καπνό, τομάτα, πιπεριά, πατάτα αλλά και κάποια είδη των οικογενειών *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* και *Leguminosae*. Προκαλεί ποιοτικές αλλά και ποσοτικές ζημιές. Στην καλλιέργεια της πατάτας για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί απώλειες στην σοδειά της τάξεως του 10-80% (Walsh *et al.* 2000).

Σε συνθήκες αγρού μεταδίδεται με μηχανικό τρόπο αλλά κυρίως με τους φυσικούς φορείς του, τις αφίδες, κατά μη έμμονο τρόπο. Η ικανότητα μετάδοσης του ιού αποκτιέται από τους φορείς, κατά την διάρκεια μικρών και επιφανειακών νυγμάτων δοκιμής λίγων δευτερολέπτων και γίνεται αμέσως μεταβιβάσιμος μετά την πρόσληψη, χωρίς να απαιτείται χρόνος εκκόλαψης. Οι αφίδες διατηρούν την μολυσματικότητα για λίγα λεπτά έως μερικές ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό (Perez 1995).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τουλάχιστον 53 διαφορετικά είδη αφίδων συμβάλλουν στην εξάπλωση του PVY. Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό φορέα, ακολουθούμενο από το είδος *Aphis gossypii* (Glover) και το *Acyrtosiphon pisum* (Harris), (Perez 1995).

Η διαφοροποίηση της μολυσματικής ικανότητας μεταξύ των ειδών, οφείλεται κυρίως στη διαφορετική συχνότητα πραγματοποίησης επιφανειακών νυγμάτων. Οι Powell *et al.* (1992) διαπίστωσαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα των ενδοκυτταρικών διεισδύσεων και τη μετάδοση του ιού Υ της πατάτας. Τα είδη των αφίδων που αποικίζουν μια καλλιέργεια, δείχνουν μια τυπική, πρώιμη συμπεριφορά δοκιμής κυτταρικού χυμού, προς εύρεση της κατάλληλης θέσης επί του ξενιστή. Αντίθετα, τα είδη που δεν αποικίζουν την καλλιέργεια, έχουν την τάση να κινούνται κατά μήκος των φύλλων και να πραγματοποιούν σύντομα νύγματα στα επιφανειακά κύτταρα του φυτού. Έτσι οι πιθανότητες για πρόσληψη και κατ' επέκταση μετάδοση του ιού, είναι πολύ μικρές (Ferreles & Collar 2001). Η παραπάνω συμπεριφορά οφείλεται στην εξειδίκευση που παρουσιάζουν οι αφίδες, κατά τη διαδικασία επιλογής του ξενιστή τους (Eastop 1973).

Ο ξενιστής προσεγγίζεται από τις αφίδες, αρχικά από το χρώμα και το άρωμά του. Στη συνέχεια, μετά την επαφή της αφίδας με το φυτό, καθοριστική σημασία έχουν τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φυτού (ανατομικά ή χημικά) και το φλοίωμα.

Πειραματικά δεδομένα, δείχνουν ότι το φυτό του καπνού *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), αποτελεί τον κύριο ξενιστή του είδους *M. persicae*. Τα πτερωτά άτομα διακρίνουν τον ξενιστή τους, λίγο μετά την επαφή τους με αυτόν. καθοριστικοί παράγοντες αυτής της διάκρισης είναι τα φυσικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φυτού αλλά και χημικές ουσίες που εντοπίζονται στην επιφάνεια του φύλλου ή στην υποδερμίδα. Ωστόσο, η ικανότητα διάκρισης διαφέρει για τα δύο τάξα του *M. persicae*, *M. persicae nicotianae* και *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*). Ο γονότυπος του καπνού φαίνεται ότι παρέχει το βέλτιστο συνδυασμό για τα άτομα που ανήκουν στο τάξο *M. persicae nicotianae*, τα οποία σύντομα τον αναγνωρίζουν ως ξενιστή και δημιουργούν εκεί αποικίες. Αντίθετα, το τάξο *M. persicae s. str.* είναι εξαιρετικά πολυφάγο και προσβάλλει τόσο τον καπνό όσο και άλλους δευτερεύοντες ξενιστές (Margaritopoulos et al. 2005).

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα μετάδοσης της νεκρωτικής φυλής του ιού PVY από άπτερα, ενήλικα άτομα της αφίδας *M. persicae* σε φυτά καπνού διαφορετικών ποικιλιών (Virginia και Oriental). Οι δύο αποικίες αφίδων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προέρχονταν η μία από την περιοχή της Μελίκης του νομού Ημαθίας και ανήκαν στο τάξο *M. persicae nicotianae* και η δεύτερη από την περιοχή των Λεχωνίων του νομού Μαγνησίας και ανήκαν στο τάξο *M. persicae sensu stricto* (s. str.).

2.1 Ανάπτυξη φυτών καπνού

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν εννιά (9) διαφορετικές ποικιλίες καπνού, οι οποίες παραχωρήθηκαν από τον Καπνικό Σταθμό Έρευνας και Κέντρο Διανομής Σπόρων Κατερίνης. Οι τρεις (3) από αυτές τις ποικιλίες ήταν δυτικού τύπου (Virginia) και οι υπόλοιπες έξι (6) ανατολικού τύπου (Oriental). Αρχικά γινόταν σπορά σε σπορεία, για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ατομικά στρογγυλά γλαστράκια. Στη συνέχεια, τα φυτά καπνού μεταφυτεύονταν σε ειδικούς δίσκους φύτευσης ανά ποικιλία, όταν βρισκόταν στο στάδιο των τριών πρώτων πραγματικών φύλλων. Οι δίσκοι φύτευσης τοποθετούνταν σε εντομοστεγή ορθογώνια κλουβιά, ώστε να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση από άτομα αφίδων. Λίγες ημέρες (2-3) μετά τη μεταφύτευση τα φυτά καπνού ήταν έτοιμα για αφιδομετάδοση.

Η ανάπτυξη των φυτών καπνού έγινε στο θερμοκήπιο του πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όπως προαναφέρθηκε τα αρχικά σπορεία γινόταν σε στρογγυλές γλάστρες διαμέτρου περίπου 15cm. Σε κάθε γλάστρα σημειώνονταν η ημερομηνία σποράς και η ποικιλία καπνού. Τα σπορεία ποτίζονταν κάθε δύο μέρες και όταν τα φυτά είχαν φτάσει σε ικανοποιητικό μέγεθος γινόταν μεταφύτευσή τους σε ειδικούς δίσκους. Στου δίσκους μεταφύτευσης σημειώνονταν αντίστοιχα η ποικιλία του καπνού.



Εικόνα 10. Μεταφτευμένα φυτά καπνού με ταμπελάκι σήμανσης

2.2 Συντήρηση του ιού

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η νεκρωτική φυλή 304 του ιού Υ της πατάτας, την οποία διέθεσε το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η συντήρηση της συγκεκριμένης φυλής έγινε σε φυτά καπνού της ανατολικού τύπου ποικιλίας Αργυρούδης 14α (ΚΠ14/α). Η διατήρηση του ιού στο εργαστήριο έγινε με μηχανικές μολύνσεις. Πρόκειται για μια διεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται λειοτρίβηση ενός τμήματος μολυσμένου φυτικού ιστού περίπου 0,5-1,0 gr, για εξαγωγή μολυσματικού χυμού. Ακολουθεί επάλειψη των φύλλων των προς μόλυνση υγιών φυτών με την πληγωτική ουσία Carborundum (600 mesh), προς δημιουργία επιφανειακών τραυμάτων ώστε να επιτραπεί η είσοδος του ιού, και εφαρμογή του μολύσματος με τη βοήθεια των δακτύλων μας. Ευνόητη είναι η χρήση γαντιών προς αποφυγή επιμολύνσεων.

Στη συνέχεια, τα μολυσμένα φυτά μεταφέρονταν σε εντομοστεγή κλουβιά, τα οποία βρίσκονταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για την ανάπτυξή τους και την ανάπτυξη συμπτωμάτων του ιού. Τα ιωμένα φυτά ποτίζονταν κάθε δύο μέρες

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Συγκεκριμένα, γινόταν μετάδοση του ιού σε νέα, υγιή φυ-

τά καπνού πριν το γήρας των ήδη μολυσμένων φυτών, επιτυγχάνοντας έτσι τη διατήρηση του ιού. Στο παράρτημα παρατίθεται το σχετικό πρωτόκολλο για την εκτέλεση των μηχανικών μολύνσεων.

2.3 Διατήρηση αποικιών αφίδων

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο κλώνοι του είδους *Myzus persicae* από το εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο ένας κλώνος προέρχονταν από την περιοχή της Μελίκης του νομού Ημαθίας και ανήκε στο τάξο *M. persicae nicotianae*, ενώ ο δεύτερος κλώνος προέρχονταν από την περιοχή των Λεχωνίων του νομού Μαγνησίας και ανήκε στο τάξο *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*).

Πριν από την έναρξη του πειράματος οι κλώνοι των αφίδων είχαν διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, τουλάχιστον έξι μηνών, σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία, φως-σκοτάδι). Η συντήρηση των αποικιών γινόταν σε κινέζικο λάχανο, σε κουτιά τύπου Blackman, στους 17° C και L16:D8. Οι αποικίες ελέγχονταν καθημερινά και γινόταν τυχόν αλλαγές στο φύλλο του λάχανου, αν αυτό κρινόταν απαραίτητο (συνήθως κάθε δύο ή τρεις μέρες).

Τέλος, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για τη διατήρηση της αποικίας είναι η καθαρότητα των φύλλων του κινέζικου λάχανου. Είναι πολύ σημαντικό να μην υπάρχουν ξένα άτομα αφίδων όχι μόνο για να μην επηρεαστεί η καθαρότητα των χαρακτηριστικών του κλώνου, αλλά και για να αποφευχθεί η εισχώρηση κάποιου επιβλαβούς για τις αφίδες παράσιτου το οποίο εκτός όλων των άλλων θα προκαλούσε και μεγάλη θνησιμότητα. Τυχόν επιμολύνσεις από πιθανές αφίδες που υπάρχουν πάνω στο φύλλο θα προκαλέσουν αλλοίωση των αποτελεσμάτων και της αξιοπιστίας του πειράματος. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητο τα φύλλα να πλένονται και να σκουπίζονται πολύ καλά πριν από τη χρήση τους.

2.4 Διαδικασία μετάδοσης PVY από άπτερα ενήλικα θυληκά άτομα

Για την πραγματοποίηση της αφιδομετάδοσης χρησιμοποιούνται άπτερα ενήλικα πρώτης ημέρας άτομα. Για την παραγωγή αυτών, τοποθετούνταν σε νέα, καθαρά κουτιά τύπου Blackman πέντε (5) apterous virginoparous females. Τρεις ημέρες αργότερα, και αφού τα αρχικά άτομα είχαν γεννήσει, οι πέντε ενήλικες μάνες αφαιρούνταν από το Blackman box και θανατώνονταν. Τα μικρά που παρέμεναν μέσα στο Blackman box συντηρούνταν στις ίδιες συνθήκες όπως και οι αποικίες (17° C, L16:D8). Γινόταν καθημερινός έλεγχος όχι μόνον του φύλλου πάνω στο οποίο αναπτύσσονταν οι αφίδες, αλλά και του σταδίου ανάπτυξης στο οποίο βρισκόταν. Μετά από 8-10 ημέρες τα μικρά ενηλικιώνονταν και ήταν έτοιμα για να ακολουθήσει η διαδικασία της αφιδομετάδοσης. Όλες οι επεμβάσεις στην αποικία των αφίδων για προσθαφαίρεση και μεταφορά ατόμων γινόταν με τη βοήθεια υγρού πινέλου λεπτής βούρτσας No. 00 προς αποφυγή πιθανού τραυματισμού τους.

Στη συνέχεια, τα πρώτης ημέρας ενήλικα άτομα τοποθετούνταν σε κενό eredolf ώστε να υποβληθούν σε κατάσταση νηστείας για 30 λεπτά. Μετά την περίοδο της νηστείας τα ενήλικα άτομα μεταφέρονταν σε μολυσμένα φυτά καπνού προκειμένου να πάρουν τον ιό. Ο χρόνος πρόσληψης του ιού ήταν τρία (3) λεπτά. Στη συνέχεια οι αφίδες παρενοχλούνταν με την μύτη του υγρού πινέλου προκειμένου να αποσύρουν τα στιλέτα τους, και μετά από προσεκτική συλλογή με τη βοήθεια του πινέλου μεταφέρονταν σε υγιή φυτά καπνού. Ο χρόνος μετάδοσης του ιού ήταν δέκα (10) λεπτά.

Τα φυτά καπνού μετά της αφιδομετάδοσης ψεκάζονταν με εντομοκτόνο σκεύασμα imidacloprid (Confidor) (δόση 300μl / 1l H₂O) ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση από νέα άτομα αφίδων. Επίσης, για τον ίδιο λόγο, τοποθετούνταν σε ειδικά εντομοστεγή κλουβιά και δεκαπέντε (15) μέρες μετά τη μόλυνση εξετάζονταν με τη μέθοδο της ELISA. Ο τύπος της ELISA που εφαρμόστηκε, ήταν η άμεση DAS-ELISA. Στο παράρτημα παρατίθεται το σχετικό πρωτόκολλο για την εκτέλεσή της.

3. Αποτελέσματα

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του πειράματος, έγινε χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Συγκεκριμένα η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πακέτο Statistica version 6.0 και τη μέθοδο της ANOVA.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, έδειξε ότι η *M. persicae* είναι ένας αποτελεσματικός φορέας του ιού ενώ η ποικιλία του καπνού δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο, καθώς οι διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 4 Ποσοστό ιωμένων φυτών καπνού που προσβλήθηκαν από τον PVY μέσω άπτερων ατόμων του *M. persicae nicotianae*

Ποικιλία	<i>M. persicae nicotianae</i> (Μελίκη)		
	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό ιωμένων	Στοιχεία παραλλακτικότητας*
Virginia			
VE9	50	10%	a, b
VE2	50	30%	c
NIK3	50	24%	a, b, c
Ανατολικές			
ΚΠ7	50	34%	c
Σ79	50	28%	b, c
BΞ81	50	8%	a
MA13/β	50	18%	a, b, c
TA21	50	24%	a, b,c
χ_1^2		0.04 (P<0.07)	

*οι ποικιλίες που δεν εμφανίζουν κοινό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Πίνακας 5 Ποσοστό ιωμένων φυτών καπνού που προσβλήθηκαν από τον PVY μέσω άπτερων απόμων του *M. persicae s. str.*

Ποικιλία	<i>M. persicae s. str.</i> (Λεχώνια)		
	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό ιωμένων	Στοιχεία παραλακτικότητας*
Virginia			
VE9	50	10%	a
VE2	50	32%	b, c
NIK3	50	26%	a, b, c
Ανατολικές			
ΚΠ7	50	44%	c
Σ79	50	24%	a, b
ΒΞ81	50	10%	a
ΜΑ13/β	50	12%	a
ΤΑ21	50	40%	b, c
χ_1^2		0.09 (P<0.002)	

*οι ποικιλίες που δεν εμφανίζουν κοινό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Ο συνολικός αριθμός υγιών φυτών καπνού που χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάδοση του PVY^N με άτομα του *M. persicae nicotianae* ήταν 400, δηλαδή 50 φυτά για κάθε ποικιλία. Μετά από εξέταση των φυτών με την ανοσοενζυμική μέθοδο DAS-ELISA, αποδείχθηκε πως ο παράγοντας «ποικιλία» τις περισσότερες φορές δεν παίζει σημαντικό ρόλο, αφού δεν υπάρχουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η ανατολικού τύπου ποικιλία ΒΞ81, της οποίας τα φυτά προσβλήθηκαν σε πολύ μικρότερο ποσοστό από όλες τις υπόλοιπες ποικιλίες.

Ομοίως, με άτομα του υποείδους *M. persicae sensu stricto* ελέγχθηκαν 400 φυτά, δηλαδή 50 για κάθε ποικιλία και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ήταν αντίστοιχα. Δηλαδή, ο παράγοντας «ποικιλία» δεν παίζει κα-

θοριστικό ρόλο στην μετάδοση του ιού. Σε αυτή την περίπτωση μόνη εξαίρεση αποτελεί η ανατολικού τύπου ποικιλία ΚΠ7, της οποίας τα φυτά προσβλήθηκαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τη γενική εικόνα.

Τέλος, η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τις μεταχειρίσεις **μιας** ποικιλίας με τα δύο υποείδη δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($\chi^2=0,02$ και $P<0,38$).

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Στη βιβλιογραφία το είδος *M. persicae* αναφέρεται ως αποτελεσματικός φορέας του ιού Υ της πατάτας. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση και του συγκεκριμένου πειράματος. Η υψηλή μολυσματική ικανότητα του είδους, οφείλεται στον βαθμό εξειδίκευσης που παρουσιάζει στο φυτό του καπνού, χωρίς να παίζει καθοριστικό ρόλο η ποικιλία. Εξαιτίας της εξειδίκευσης αυτής, η συχνότητα επιφανειακών νυγμάτων είναι μεγάλη. Όταν πρόκειται για μη- έμμοιο ιό, όπως στο συγκεκριμένο πείραμα, όσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα των νυγμάτων, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ποσοστό μετάδοσης του ιού, όπως ειπώθηκε και από τους Powell *et.al.* (1992).

Προηγούμενες πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι, το υποείδος *M. persicae nicotianae* παρουσιάζει εξειδίκευση στο φυτό του καπνού, ενώ το *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*) είναι εξαιρετικά πολυφάγο. Στηριζόμενος κάποιος σε αυτό θα μπορούσε να αναμένει μικρότερη μετάδοση του ιού από τα άτομα του υποείδους το *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*). ωστόσο κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα. Αντίθετα ο ιός μεταδόθηκε αποτελεσματικά και από τα δύο υποείδη προς όλες τις ποικιλίες. Η ελάχιστη μικρότερη ικανότητα των ατόμων του υποείδους *M. persicae sensu stricto* (*s. str.*) πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το υποείδος δεν παρουσιάζει εξειδίκευση στον καπνό και γι' αυτό τα άτομα έχουν την τάση να κινούνται κατά μήκος του φύλλου πριν πραγματοποιήσουν ενδοκυτταρικές διατρήσεις. Επίσης, αυτή η συμπεριφορά συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι τα άτομα της *M. persicae*, διακρίνουν τον ξενιστή στηριζόμενα στα φυσικά χαρακτηριστικά του και στις χημικές ουσίες που υπάρχουν στην επιφάνειά του και όχι στις ενδοκυτταρικές διατρήσεις.

Συνοπτικά, τα συμπεράσματα που διεξήχθησαν από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος, ήταν τα παρακάτω:

- και το εξειδικευμένο (*M. persicae nicotianae*) και το πολυφάγο (*M. persicae sensu stricto*) είδος μεταδίδουν αποτελεσματικά τη νεκρωτική φυλή του PVY
- ο παράγοντας ποικιλία δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού, αφού μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά την αποτελεσματικότητα μετάδοσης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Τέλος, αξίζει να επισημανθεί η σημασία της παρουσίας των πληθυσμών του είδους *M. persicae* σε μια περιοχή όπου καλλιεργείτε καπνός. Η καταλληλότητα του καπνού ως ξενιστή, ιδιαίτερα για το υποείδος *M. persicae nicotianae*, έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση του πληθυσμού των αφίδων σε συνδυασμό με την μεγάλη μολυσματική ικανότητα που παρουσιάζουν και τις ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να επικρατούν, συμβάλλουν στην εκδήλωση μιας επιδημίας. Συνεπώς, η μείωση της παραγωγής καπνού είναι αναπόφευκτη. Για τον περιορισμό των δυσμενών επιπτώσεων στην παραγωγή, απαιτείται η έγκαιρη εφαρμογή των κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων που θα διατηρήσουν τον πληθυσμό των αφίδων κάτω από το επίπεδο οικονομικής ζημιάς.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

ΥΛΙΚΑ:

1. Φυτό – δότης (απ' όπου προέρχεται το δείγμα)
2. Φυτοδείκτες
3. Γουδί και γουδοχέρι
4. Ρυθμιστικό διάλυμα (φωσφορικό 0,01 M pH 7,0)
5. Carborundum (ανθρακοπυρίτιο)
6. Πιπέτες Pasteur
7. Υδροβολέας
8. Ταμπέλες και μολύβι

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Σημειώνουμε τα φύλλα που πρόκειται να μολύνουμε
2. Απλώνουμε στα φύλλα που πρόκειται να μολύνουμε ένα λεπτό στρώμα Carborundum (600 mesh) χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό δοχείο καλυμμένο με δικτυωτό ύφασμα (τούλι)
3. Λειοτριβούμε το μολυσμένο φυτικό ιστό (περίπου 0,5-1,0 g φυτικού ιστού, αραίωση 1/10 ή 1/100) χρησιμοποιώντας γουδί και ρυθμιστικό διάλυμα
4. Με καθαρά χέρια παίρνουμε μια ποσότητα μολύσματος και στηρίζοντας την κάτω επιφάνεια του φύλλου του φυτοδείκτη που θέλουμε να μολύνουμε απλώνουμε απαλά το μόλυσμα στην επάνω επιφάνειά του.
5. Μετά από μερικά λεπτά ξεπλάνουμε με νερό βρύσης τα φύλλα που μολύναμε.
6. Σημαίνουμε τα μολυσμένα φυτά, αναγράφοντας την ημερομηνία μόλυνσης, την προέλευση του μολύσματος (π.χ. καπνός, περιοχή) και τον ιό (εφόσον είναι γνωστός) ή τον κωδικό του δείγματος εφόσον δεν είναι γνωστός.
7. Πλένουμε τα χέρια μας με νερό και σαπούνι και μεταφέρουμε τα φυτά σε θάλαμο αναπτύξεως για ανάπτυξη συμπτωμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ DAS ELISA

ΒΗΜΑ 1^ο

1. Τοποθέτηση της γ- ανοσοσφαιρίνης σε διάλυμα COATING BUFFER (IgG).
2. Η αραιώση για την συγκεκριμένη γ- ανοσοσφαιρίνη είναι 1/1000 ή 1/333.
3. Επώαση για 3 ώρες στους 37° C αφού καλύψουμε την μικροπλάκα με μεμβράνη.
4. Πλύσιμο της μικροπλάκας 3 φορές επί 3 λεπτά με διάλυμα PBS-TWEEN.
5. ΠΡΟΣΟΧΗ: γέμισμα μόνο των εσωτερικών πηγαδιών της μικροπλάκας. Τα εξωτερικά- περιφερειακά γεμίζονται πάντα με νερό για να γίνει ομοιόμορφα το ζέσταμα στο φούρνο.

ΒΗΜΑ 2^ο

1. Διάλυμα λειοτρίβησης PBS- TWEEN.
2. Σε κάθε σακουλάκι με το απαραίτητο κομμάτι φύλλου, προσθήκη 1,5 ml από το PBS- TWEEN.
3. Διατηρώ τα σακουλάκια μέχρι τη λειοτρίβηση αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής σε πάγο.
4. Επιλογή φύλλου: το βάρος του λειοτριβόμενου φύλλου είναι το 1/10 αυτού που αρχικά επιλέγω.
5. Πάντα βάζω ένα θετικό βοθρίο (αφυδατωμένη μορφή ή μόλυσμα από φρέσκο ιστό) και ένα τελείως καθαρό.
6. Τοποθέτηση της μικροπλάκας στο ψυγείο όλη τη νύχτα.

ΒΗΜΑ 3^ο

1. Καλό ξέπλυμα της μικροπλάκας 3 φορές με διάλυμα PBS- TWEEN για να φύγει το πράσινο χρώμα. Επανάληψη της πλύσης τρεις (3) φορές.
2. Προσθήκη συζευγμένης γ- ανοσοσφαιρίνης. Εφαρμόζουμε αραιώση όπως αρχικά, σε διάλυμα PBS- TWEEN.
3. Επώαση για τρεις (3) ώρες στους 37° C.
4. Καλό πλύσιμο της μικροπλάκας με διάλυμα PBS- TWEEN.

ΒΗΜΑ 4^ο

1. SUBSTRATE BUFFER και PNPP

Παρασκευή: η αναλογία είναι πάντα 1mg/1ml η παρανιτροφαινόλη στο buffer

2. 10ml substrate buffer προσθήκη παρανιτροφαινόλης ανάδευση.
3. Τοποθετώ 100μ SUBSTRATE BUFFER σε κάθε βοθρίο με πολυτυπία.
4. Με την παραπάνω διαδικασία παίρνει σε λίγο χρόνο το κίτρινο χρώμα σε θερμοκρασία δωματίου.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ DAS ELISA

ΔΙΑΛΥΜΑ PBS 10X

Δ/ΜΑ	250ml	500ml	750ml	1000ml	2000ml
NaCl(gr)	20	40	60	80	160
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O(gr)	3,6	7,15	10,75	14,3	28,6
KCl (gr)	0,5	1	1,5	2	4
KH ₂ HPO ₄ (gr)	0,5	1	1,5	2	4

Δ/ΜΑ Coating Buffer

Δ/ΜΑ	250ml	500ml	750ml	1000ml	2000ml
Na ₂ CO ₃ (gr)	0,3975	0,795	1,1925	1,59	3,18
NaHCO ₃ (gr)	0,7325	1,465	2,1975	1,465	2,93

Δ/ΜΑ PBS- TWEEN

Δ/μΑ	0,5 lt	1 lt	2 lt	4 lt	5 lt
PBS 10X ml	50	100	200	400	500
TWEEN ml	0,25	0,5	1	2	2,5
dH ₂ O ml	449,75	899,5	1799	3598	4497,5

Διάλυμα για μηχανικές μολύνσεις- Phosphate Buffer

Για την παρασκευή του φωσφορικού διαλύματος (Phosphate Buffer) απαιτούνται διάλυμα Α σύστασης 13,6 gr KH_2PO_4 / 1 lt απεσταγμένου νερού και το διάλυμα Β σύστασης 35,89 gr Na_2HPO_4 12 H_2O / 1 lt απεσταγμένου νερού. Τα διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 4/6, δηλαδή 400ml από το διάλυμα Α και 600 ml από το διάλυμα Β.

Διάλυμα Α

Δ/μα	100ml	200ml	500ml	1000ml
KH_2PO_4 (gr)	1,36	2,72	6,8	13,6

Διάλυμα Β

Δ/μα	100ml	200ml	500ml	1000ml
Na_2HPO_4 (gr)	3,589	7,178	17,945	35,89

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Balckman, R. L.** (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bull. Entomol. Res.* **60**, 533-546.
- Balckman, R. L.** (1972) The inheritance of life- cycle differences in *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* **62**, 281-294.
- Balckman, R. L.** (1974) Life cycle variation in *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera, Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bull. Entomol. Res.* **63**, 595-607.
- Balckman, R. L. & Eastop, V. F.** (1984) "*Aphids on the World's Crops: an Identification Guide*". Wiley- Interscience publication. Chichester. pp.314
- Bokx, J. A. & Huttinga H.** (1981) Potato virus Y. <http://www.dpvweb.net>.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L.** (1996) "Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIBE Database". Cab International.
- Brook, A. J.** (1968) The effect of plant spacing on the numbers of ophids trapped over the groundnut crop. *Ann. Appl. Biol.* **61**, 289-294.
- Buchen, C. & Osmmond, C.** (1987) Potato Y potyvirus. Descriptions of plant Viruses 242.
- Collar, J. L. & Fereres, A.** (1998) Nonpersistent Virus Transmission Efficiency Determined by Aphid Probing Behavior During Intracellular Punctures. *Environ. Entomol.* **27**(3), 583-591.
- DiFonso C. D.** (1995) Epidemiology and control of potato virus Y (PVY) in the Red River Valley of Minnesota and North Dakota.
- Dixon, A. F. G.** (1998) *Aphid Ecology*. Second Edition. Blackie, Glasgow.
- Eastop, V. F.** (1973) Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. In H. F. van Emden (eds), *Insect- Plant Relationships*. Academic Press. London. pp. 157-178.

- Fereres, A., Perez, P., Gemeno, C. & Ponz, F.** (1993) Transmission of Spanish Pepper and Potato PVY Isolates by Aphid (Homoptera: Aphididae) Vectors: Epidemiological Implications. *Environ. Entomol.* **22**(6), 60-1265.
- Fereres, A. & Collar, J. L.** (2001), Analysis of Noncirculative Transmission by Electrical Penetration Graphs. In K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus (eds.), *Virus Insect Plant Interaction*. Academic Press. New York. pp. 87-103.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ.** (1984) Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας. **8**, 199-213.
- Harris, K. F.** (1977) An ingestion- egestion hypothesis of non- circulative virus transmission. In K. F. Harris & K. Maramorosch (eds.), *Aphids as Virus Vectors*. Academic Press. New York. pp. 165-220.
- Harris, K. F. & Harris, L. J.** (2001) Ingestion- Egestion Theory of Cuticula-Borne Virus Transmission. In K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus (eds.), *Virus Insect Plant Interaction*. Academic Press. New York. pp. 111-129.
- Heie, O. E.** (1980) *The aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. II. The Family Drepanosiphidae*. Scandinavian Science Press, Klampenborg. pp. 176.
- Katis, N., Tsitsipis, I. A., Avgelis, A., Gargalianou, J., Papapanayotou, A. & S. Milla.** (1998) Aphid populations and potato virus Y potyvirus (PVY) spread in potato fields. pp. 585-593.
- Κατής, Ν. Ι.** (2004) *Ιολογία φυτών*. Εκδόσεις Πήγασος. Θεσσαλονίκη. pp. 378.
- Κατής, Ν. Ι.** (2004) *Σημειώσεις Ιολογίας*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. pp. 82.
- Kennedy, J. E., Day S. T. & Eastop, V. F.** (1962) *A conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*, Commonwealth Institute of Entomology, London. pp. 112.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Goundoudaki, S. & Blackman R. L.** (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in Greece. *Bull. Entomol. Res.* **92**, 309-320.

- Margaritopoulos, J. T., Tsourapas, C., Tzortzi, M., Kanavaki O. M. & Tsitsipis J. A.** (2005) Host selection by winged colonizers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialization. *Ecolog. Entomol.* **30**, 1-13.
- Martin, B., Collar, J. L., Tjallingii, W. F. & Fereres, A.** (1997) Intracellular salivation and ingestion by aphids causes the inoculation and acquisition of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.* **78**, 2701-2705.
- Mathews, R. E. F.** (1991) Control measures and vector avoidance. *In* Plant Virology, 3rd edition. Academic. New York. pp. 611-618.
- Papadopoulou, A., Chrysoschoou, A. P., Katis, N., Sannino, L., Tarantino, P. & Lahoz, E.** (2004) Evaluation of new insecticides, aphid alarm pheromone, biopesticides, application techniques. *II Tabacco* **12**, 74-81.
- Perez, P., Collar, J. L., Avilla, C., Dugue, M. & Fereres, A.** (1995) Estimation of Vector Propensity of Potato Virus Y in Open – Field Pepper Crops Of Central Spain. *Ecolog. Entomol.* **88**, 986-991.
- Powell, G.,** (1991) The effect of mineral oil on stylet activities and potato virus by aphids, *Entomol. Exp. Appl.* **63**, 237-242.
- Powell, G., Harrington, R. & Spiller, N. J.** (1992) Stylet activities and potato virus Y vector efficiencies by the aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoideis*. *Entomol. Exp. Appl.* **62**, 293-300.
- Shaposhnikov, G. Ch.** (1985) The main features of the evolution of aphids. *In* "Evolution and Biosystems Of Aphids", Proceedings of the International Aphidological Symposium at Jablonna, 1981, Polska Akademia Nauk, Ossolineum, Warszawa, pp. 19-99.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. και Κατσόγιαννος, Β. Ι.** (2003) Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος. Αθήνα. pp. 360.
- Van Emdem, H. F., Eastop, V. F., Hughes, R. D. & Way, M. J.** (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Ann. Rev. Entomol.* **14**, 197-270.
- Walsh, K., North, J., Barker, I. & Boonham, N.** (2000) Detection of different strains of *Potato virus Y* and their mixed infection using competitive fluorescent RT-PCR. *J. Virol. Met.* **91**, 167-173.

Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., Lopez-Moya, J. J., & Pironone, T. P. (1996). Loss of potyvirus transmissibility and helper- component activity correlate with non- retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **77**,861-867.

Wang, R. Y., Amara, E. D., & Jones-McAtee, J. L. (1994).
The effect of polymeric materials on the stability and
performance of microarrays. *Journal of Microencapsulation*,
11(1), 1-10.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000073778